



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

**ESCOLA DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DOUTORADO 2011-2016**

**ANÁLISE DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS  
RETICULOCITÁRIOS PARA O MONITORAMENTO DA  
ANEMIA EM PACIENTES EM DIÁLISE PERITONEAL**

**Nome: Júlio Cezar Merlin**

**CURITIBA  
2016**

**JÚLIO CEZAR MERLIN**

**ANÁLISE DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS  
RETICULOCITÁRIOS PARA O MONITORAMENTO DA  
ANEMIA EM PACIENTES EM DIÁLISE PERITONEAL**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Escola de Medicina, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

**Orientador:** Prof. Dr. Roberto Pecoits-Filho

**CURITIBA  
2016**

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Roberto Pecoits-Filho, pessoa fundamental nesta empreitada, pela atenção, apoio, competência e principalmente pela amizade e confiança depositada, mesmo nos momentos mais difíceis. Grande exemplo de pesquisador que acredita que a ciência não tem fronteiras e que o conhecimento deve ser sempre compartilhado.

Aos pacientes do Instituto do Rim de Curitiba, que mesmo muitas vezes cansados, se dispuseram prontamente para participar da pesquisa.

Ao Instituto do Rim de Curitiba por ter permitido o desenvolvimento deste estudo e, em especial, à Silvana que sem a sua intensa colaboração, este trabalho não teria chegado ao fim.

A aluna de PIBIC Ana Paula Ruthes que fez todo o levantamento de dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos prontuários dos pacientes participantes da pesquisa.

A Professora Doutora Márcia Olandoski incansável e sempre pronta, na busca dos resultados estatísticos.

Ao departamento científico da Sysmex, em especial a pessoa da Doutora Helena Grotto, que foi sensível ao desenvolvimento deste projeto e aos colegas do setor de hematologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, onde os hemogramas foram realizados.

A Jane, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, PUCPR, pela paciência, atenção e especial cuidado com todos os alunos.

À Mauren, companheira de todas as horas, incentivadora contumaz durante todos esses anos e que sempre, de uma forma muito especial e carinhosa, me ajudou a vencer cada um dos obstáculos.

Aos meus filhos Júlio Filho e Guilherme, pela compreensão dos sábados e domingos que não pudemos estar juntos e simplesmente pela alegria de tê-los como filhos.

E, finalmente gostaria de agradecer aos meus pais (*in memoriam*), que nunca mediram esforços para que eu pudesse chegar até aqui. Tenho plena convicção que, ao lado de Deus, estão felizes e orgulhosos.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AEE – Agentes Estimuladores da Eritropoiese

DP – Diálise Peritoneal

DPAC – Diálise Peritoneal Ambulatorial Contínua

DPCC – Diálise Peritoneal Contínua com Cicladora

DRC – Doença Renal Crônica

EPO - Eritropoietina

HB – Hemoglobina

Hb - Hemoglobina

HD – Hemodiálise

IST – Índice de Saturação da Transferrina

NKF/KDOQI - National Kidney Foundation / Kidney Disease Outcomes Quality Initiative

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

TSR – Terapia Substitutiva Renal

NHANES III – The third US National Health and Nutrition Examination Survey

EBPG – European Best Practice Guideline

ERBP – European Renal Best Practice

KDIGO – Kidney Improving Global Outcomes

VCM – Volume Corpuscular Médio

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

CHCM – Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

RDW – Red-Blood Cell Distribution Width

DNA – Ácido Desóxirribonucleico

TfR – Receptor de Transferrina

sTfR – Receptor Solúvel de Transferrina

RET-He – Equivalente de Hemoglobina nos Reticulócitos

ADC – Anemia de Doença Crônica

RNA – Ácido Ribonucleico

HFR – *High Fluorescence Reticulocyte* – Reticulócito de Alta Fluorescência

MFR – *Medium Fluorescence Reticulocyte* - Reticulócito de Média Fluorescência

LFR – *Low Fluorescence Reticulocyte* - Reticulócito de Baixa Fluorescência

IRF – *Index Reticulocyte Fraction* - Fração de Reticulócitos Imaturos

PCR – Proteína C Reativa

HAMP – *Hepcidin Antimicrobial Peptide*

IL-6 – Interleucina-6

IL-1 – Interleucina-1

IL-1 $\beta$  – Interleucina-1 $\beta$

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$

AGEs – Produtos de Glicação Avançados

MCP-1 – *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

STAT3/Smad4 – *Signal Transducer and Activators Peptide*

IL-6R – Receptor de IL-6

sIL-6R – Receptor solúvel de IL-6

TLRs – *Toll Like Receptor*

TLR4 – *Toll Like Receptor-4*

LPS – Lipopolissacarídeos

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IRE – Índice de Resistência a Eritropoietina

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

BD – Bencton & Dickson

EDTA-K<sub>2</sub> – Ácido Etileno Diamino Tetracético, Dipotássico

CLSI – *Clinical and Laboratory Standarts Institute*

ICSH – *International Council for Standardization in Hematology*

VPM – Volume Plaquetário Médio

PDW – *Platele Distribution Width*

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Valores mínimos de hemoglobina levando-se em consideração raça, gênero e idade .....	2
<b>Tabela 2:</b> Valores mínimos e valores alvos para hemoglobina na DRC.....	4
<b>Tabela 3:</b> Parâmetros disponibilizados no analisador hematológico modelo XE-5000 (Sysmex) .....	22
<b>Tabela 4:</b> Relação entre parâmetros e métodos utilizados no XE-5000 (Sysmex).....	26
<b>Tabela 5:</b> Características gerais da população estudada .....	31
<b>Tabela 6:</b> Deficiência da disponibilidade e do ferro de depósito, utilizando-se os parâmetros Ferritina, IST% e RET-He .....	32
<b>Tabela 7:</b> Valores encontrados para contagens de reticulócitos. RET%, RET#, IRF%, RET-He.....	33
<b>Tabela 8:</b> Valores encontrados para contagens de reticulócitos. RET%, RET#, IRF%, RET-He.....	34
<b>Tabela 9:</b> Resultados dos biomarcadores inflamatórios analisados no estudo.....	35
<b>Tabela 10:</b> Análise de correlação entre IL-6 e atividade eritropoiética.....	36
<b>Tabela 11:</b> Análise de correlação entre valores de HB e IRF%, considerando valores $\leq 10,5$ e $> 10,5$ .....	36

## LISTAS DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Incidência de anemia em pacientes e em diferentes estágios da DRC e TSR.....	4
<b>Figura 2:</b> Produção da eritropoietina pelo rim e mecanismo de ação.....	5
<b>Figura 3:</b> Estrutura molecular da hepcidina, peptídeo maior (25 aminoácidos).....	15
<b>Figura 4:</b> Ação da hepcidina no controle do <i>status</i> de ferro sistêmico.....	15
<b>Figura 5:</b> Metabolismo do ferro. Controle celular e sistêmico do ferro.....	16
<b>Figura 6:</b> Conjunto de prováveis causas de resistência aos AEE em pacientes com DRC.....	17
<b>Figura 7:</b> Relação entre a dose e responsividade no uso de AEE e a concentração plasmáticas de IL-6.....	17
<b>Figura 8:</b> Método da impedância elétrica. Mecanismo de contagem das células.....	23
<b>Figura 9:</b> Diagrama do processo de dispersão da luz laser. Citometria de fluxo com ângulos de dispersão do raio laser, determinando o tamanho e o grau de complexidade da célula (Sysmex, Kobe, Japão).....	24
<b>Figura 10:</b> Citometria de fluxo fluorescente (Sysmex, Kobe, Japão).....	25
<b>Figura 11:</b> Fluorescência para contagem de reticulócitos totais, IRF- LFR, MFR e HFR (Sysmex, Kobe, Japão).....	27
<b>Figura 12:</b> Método Luminex® .....	28
<b>Figura 13:</b> Etapas do processo de reação e leitura (Luminex®).....	28
<b>Figura 14:</b> Mecanismos magnético de leitura em monocamada, Luminex® .....	29
<b>Figura 15:</b> Análise considerando RET# e IRF% e ponto de corte 4 <sup>o</sup> quartil IRE (0,102).....	34
<b>Figura 16:</b> Análise considerando RET# e IRF% e ponto de corte 4 <sup>o</sup> quartil IRE (0,102).....	35

## **LISTAS DE ANEXOS**

**Anexo 1:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....50

**Anexo 2:** Parecer de Aprovação – Comitê de Ética.....52

## RESUMO

A anemia é uma complicação comum e com impacto em morbi-mortalidade de pacientes com doença renal crônica (DRC). Os marcadores atuais para o diagnóstico e monitoramento da anemia na DRC são limitados pela interrelação entre a eritropoiese, reservas de ferro e da resistência a ação dos agentes estimuladores da eritropoiese e da inflamação.

O objetivo deste estudo foi de analisar o papel de novos parâmetros hematológicos laboratoriais reticulocitários IRF e RET-He no monitoramento da anemia e da resistência ao uso de AEE em pacientes com DRC e em diálise peritoneal.

Este foi um estudo multicêntrico observacional prospectivo incluindo pacientes clinicamente estáveis em diálise peritoneal. Os parâmetros laboratoriais recomendados pelas diretrizes foram confrontados com novos parâmetros hematológicos IFR e RET-He, avaliados pelo analisador hematológico automatizado da marca Sysmex, modelo XE-5000. Marcadores inflamatórios foram avaliados pelo método Luminex.

Trinta e cinco pacientes ( $59\pm 13$  anos, 51% homens, 43% diabéticos) foram incluídos no estudo. A hemoglobina foi de  $12,2\pm 2,0$  g/dL e 87% apresentavam resistência a AEE. O RET-He identificou uma proporção menor de deficiência de ferro (12%) comparado a ferritina (82%) e IST (51%). Pacientes com índice de resistência a eritropoietina (IRE) no quartil superior apresentaram um percentual de IRF e MFR significativamente maior e um percentual menor de LFR quando comparados com pacientes nos quartis mais baixos de IRE. Os níveis de IL-6 se correlacionaram com o percentual de MFR ( $r = 0,45$ ,  $p < 0,03$ ).

Concluimos que os novos parâmetros hematológicos parecem agregar valor na identificação de mobilização e deficiência de ferro, bem como na identificação de pacientes com resistência a eritropoietina induzida pela inflamação. Estudos futuros devem validar nossos achados em populações maiores e com seguimento prospectivo.

*Palavras-chave:* anemia, diálise peritoneal, resistência, eritropoietina, ferro.

## ABSTRACT

Anemia is a common complication and has an impact on morbidity and mortality in patients with chronic kidney disease (CKD). Current markers for the diagnosis and monitoring of anemia in CKD are limited by the interrelation between erythropoiesis, iron stores, inflammation and the resistance to treatment with erythropoiesis stimulant agents.

The aim of this study was to analyze the role of new hematological parameters IRF and RET-He in the monitoring and AEE resistance of CKD anemia in peritoneal dialysis patients.

This was a prospective, observational multicenter study including clinically stable patients on peritoneal dialysis. The laboratory parameters recommended by the guidelines were compared with new hematological parameters evaluated by the automated hematology analyzer Sysmex, model XE-5000. Inflammatory markers were evaluated using the Luminex method.

Thirty-five patients ( $59 \pm 13$  years old, 51% men, 43% diabetics were included in the study.) Hemoglobin was  $12.2 \pm 2.0$  g/dL and 87% had resistance to ESA. (IRE) in the upper quartile presented a significantly higher percentage of IRF and MFR, and a lower percentage of iron deficiency (12%) compared to ferritin (82%) and STI (51%). IL-6 levels correlated with the percentage of MFR ( $r = 0.45$ ,  $p < 0.03$ ).

We conclude that the new hematological parameters may add value in the identification of iron mobilization and deficiency, as well as in the identification of patients with resistance to erythropoietin induced by inflammation. Future studies should validate our findings in larger populations and with prospective follow-up.

*Key words:* anemia, peritoneal dialysis, resistance, erythropoietin, iron.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Objetivo Específicos .....</b>	<b>19</b>
<b>3 MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43</b>
<b>8 ANEXOS.....</b>	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento progressivo da incidência e prevalência da Doença Renal Crônica (DRC) em todo o mundo, é um importante problema de saúde pública, principalmente pelas suas características, pelo seu caráter progressivo e irreversível, bem como pelo importante impacto na morbi-mortalidade dos pacientes (CASTRO *et al*, 2010). Embora tenha origem multifatorial, é caracterizada por lesão renal com perda progressiva e irreversível da função dos rins, baseada na estimativa da taxa de filtração glomerular (TFG), que estratifica a doença em 5 diferentes estágios: estágio 1, TFG  $\geq 90$  mL/min/1,73m<sup>2</sup>; estágio 2, TFG entre 60 – 89 mL/min/1,73m<sup>2</sup>; estágio 3, TFG entre 30 – 59 mL/min/1,73m<sup>2</sup>; estágio 4, TFG entre 15 – 29 mL/min/1,73m<sup>2</sup>; estágio 5, TFG  $< 15$  mL/min/1,73m<sup>2</sup> (O'MARA, 2008; KDOQI, 2002). Indivíduos que se encontram no Estágio 5, também denominado de estágio final da DRC, são avaliados para o início de Terapias de Substituição da função Renal (TSR) em suas diferentes modalidades, especificamente hemodiálise (HD), diálise peritoneal (DP) ou transplante renal (JUNIOR, 2001; KDIGO, 2006).

Entre as modalidades de TSR existentes, a DP tem se destacado por promover resultado clínico equivalente a HD, porém, permitindo uma melhor qualidade de vida aos pacientes e um tratamento domiciliar. A DP é um processo que utiliza a membrana peritoneal e sua capacidade fisiológica de semipermeabilidade para a depuração de toxinas do sangue, provocado através da introdução no peritônio de soluções com composição eletrolítica predefinida e capacidade de ultrafiltração induzida por hipertonicidade, geralmente a partir de glicose hipertônica. Duas modalidades de DP são atualmente utilizadas para esse processo, denominadas de Diálise Peritoneal Ambulatorial Contínua (DPAC) e Diálise Peritoneal Contínua com Cicladora (DPCC).

Apesar da diálise promover uma eficiente remoção de solutos e gerar ultrafiltração, as funções endócrinas dos rins se mantem alteradas, e complicações como a hipertensão resistente, os distúrbios da homeostase da glicose e aminoácidos, os distúrbios do metabolismo mineral estão presentes em pacientes com os estágios mais avançados da DRC, causando um importante impacto nas complicações da DRC. Da mesma forma, a DRC induz uma disfunção imune, caracterizada por um status de inflamação crônica e uma dificuldade na resposta inata e adaptativa. Finalmente, um complexo distúrbio hematológico

com consequente disfunção na eritropoiese se desenvolve com a progressão da DRC, conforme descrito na seção a seguir.

## 1.1 ANEMIA NA DRC

A presença de anemia em paciente com DRC, é um achado comum, com marcada intensificação com o declínio da função renal, incluindo, obviamente, aqueles em uso de TSR, entre as quais, a DP. Nestes últimos, a anemia é considerada um fator de risco independente para progressão da DRC e de mortalidade (GONÇALVES, 2012; SMRZOBA *et al*, 2005). Baseado nos estudos de Scripps-Kaiser de 1998 a 2001 e do NHANES III (the third US National Health and Nutrition Examination Survey), considerados dois dos mais robustos estudos já realizados para determinação dos valores de referência para hemoglobina, Beutler em 2006, propõe que seja considerado um indivíduo anêmico, na população em geral, aqueles com taxas de hemoglobina inferiores ao valor mínimo de referência, conforme a Tabela 1.

**Tabela 1:** Valores mínimos de Hemoglobina levando-se em consideração raça, gênero e idade (BEUTLER, 2006)

GRUPO	HEMOGLOBINA – g/dL
<b>Homens Brancos</b>	
20 – 59 anos	13,7
> 60 anos	13,2
<b>Mulheres Brancas</b>	
20 – 49 anos	12,2
> 50 anos	12,2
<b>Homens Negros</b>	
20 -59 anos	12,9
> 60 anos	12,7
<b>Mulheres Negras</b>	
20 – 49 anos	11,5
> 50 anos	11,5

BEUTLER, 2006, baseado nos estudos Scripps-Kaiser e no estudo NHANES III

### 1.1.1 Epidemiologia e prevalência da anemia na DRC

No entanto, pacientes com DRC e com TFG inferior a  $60 \text{ mL/min/1,73m}^2$ , segundo a prevalência de alguns estudos, os valores de hemoglobina para a definição de anemia foram para o EBPB (European Best Practice Guidelines): 11,5 g/dL para mulheres, 13,5 g/dL para homens e 12,0 g/dL para aqueles com idade maior que 70 anos; NKF/KDOQI (National Kidney Foundation / Kidney Disease Outcomes Quality Initiative): 12,0 g/dL para mulheres e 13,5 g/dL para homens; KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes): 12,0 g/dL para mulheres e 13,0 g/dL para homens (Tabela 2). Ainda, segundo alguns estudos, a prevalência de anemia aumenta em 1% naqueles com TFG média de  $60 \text{ mL/min/1,73m}^2$ , 9% nos com TFG média de  $30 \text{ mL/min/1,73m}^2$  e 33% nos com TFG média de  $15 \text{ mL/min/1,73m}^2$  em homens e 67% em mulheres (KDOQI, 2002; ASTOR, 2002; CORESH, 2003; O'MARA, 2008).

Recentemente, em 2012, o KDIGO definiu e ratificou como valores mínimos para hemoglobina, 13,0 g/dL e 12,0 g/dL em pacientes com DRC, homens e mulheres, respectivamente e considerando adultos e crianças com idade maior que 15 anos. No entanto, o valor alvo de tratamento com agentes estimuladores de eritropoiese desejável, de forma independente, é uma hemoglobina entre 11,0 g/dL e 12,0 g/dL, não ultrapassando 13,0 g/dL. Na tabela 2 estão demonstrados valores mínimos e valores alvos para hemoglobina em pacientes com DRC, de acordo com a proposição de alguns estudos ou consensos (ALVES, 2015).

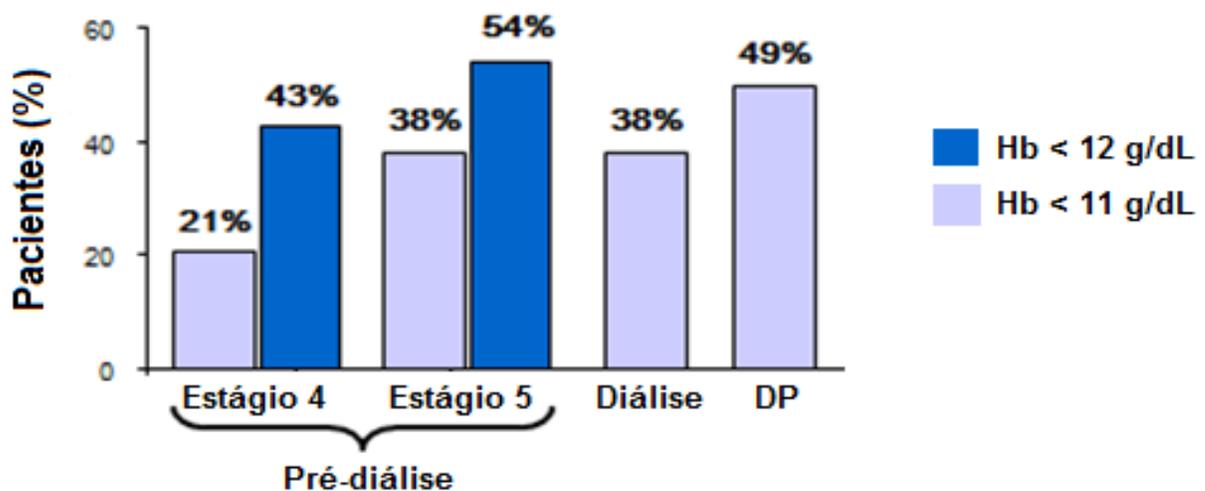
De acordo com estas definições é possível identificar a prevalência da anemia na DRC. De forma similar aos verificados em estudos observacionais, níveis de HB abaixo de 11g/dL são comuns em pacientes com DRC, especialmente em Estágios 4 e 5, incluindo as modalidades dialíticas, como descrito na Figura 1.

**Tabela 2:** Valores mínimos e valores alvos para hemoglobina na DRC.

	EBPG	NKF/KDOQI	ERBP 2008	KDIGO 2012
VALORES DE HB (critérios de anemia)				
Mulheres	11,5 g/dL	12,0 g/dL	12,0 g/dL	12,0 g/dL
Homens	13,5 g/dL	13,5 g/dL	13,5 g/dL	13,0 g/dL
	12,0 g/dL (> 70 anos)			
HEMOGLOBINA	> 11,0 g/dL	> 11,0 g/dL	> 11,0 g/dL	> 11,0 g/dL
ALVO	< 13,0 g/dL	< 12,0 g/dL	< 12,0 g/dL	< 12,0 g/dL
	Não acima de 14,0 g/dL	Não acima de 13,0 g/dL	Não acima de 13,0 g/dL	Não acima de 13,0 g/dL

EBPG: European Best Practice Guideline; NKF/KDOQI: National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative; ERBP: European Renal Best Practice; KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes (modificado de ALVES, 2015).

**Figura 1:** Incidência de anemia em pacientes com diferentes estágios da DRC e TSR (<sup>1</sup>CANZIANI *et al*, 2006; <sup>2</sup>SESSO *et al*, 2007; <sup>3</sup>FERNANDES, 2008)



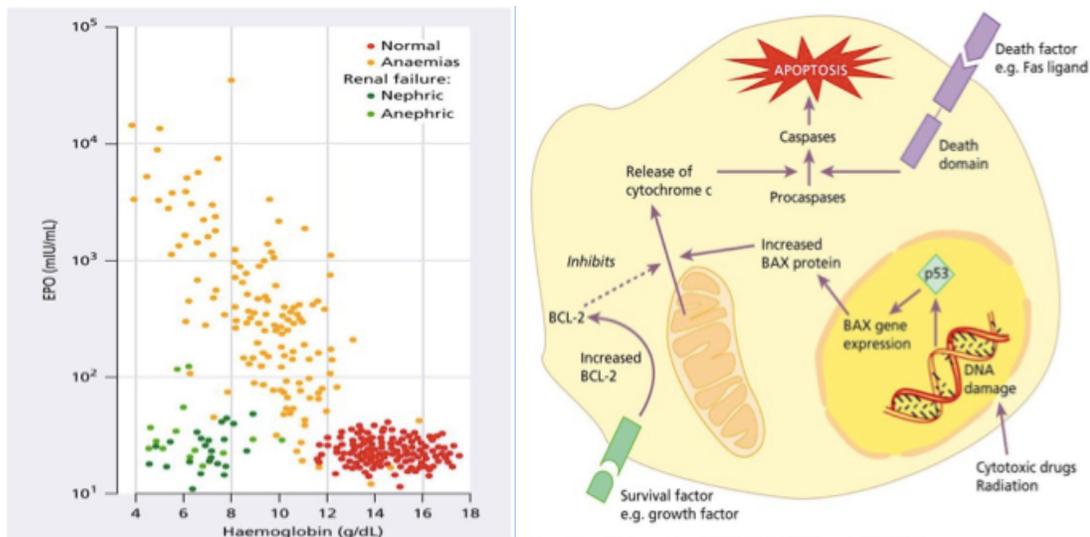
DP: diálise peritoneal; Hb: hemoglobina.

### 1.1.2 Mecanismos da anemia na DRC

A causa principal e inicial de anemia em pacientes com DRC ocorre devido à deficiência relativa na produção de eritropoietina (EPO), pelo fato de 90% desta glicoproteína ser

produzida nas células peritubulares renais e fibroblastos intersticiais (Figura 2). A EPO age de forma direta sobre as células precursoras eritróides na medula óssea, com ação anti-apoptótica por mecanismo de inibição da via das caspases (KOURY, 1998; ABENSUR, 2006; HAYAT, 2009) (Figura 2). Todavia, outras causas como hiperparatireoidismo secundário (elevação do Paratormônio – PTH), carência nutricional (hipovitaminoses, deficiência de ácido fólico, etc), sangramentos crônicos, perda de sangue em TSR (HD), estado inflamatório crônico e deficiência de ferro, compõem fatores adicionais importantes na evolução e persistência do estado anêmico, caracterizando, desta forma, uma patogênese de origem múltipla. Porém, os dois últimos têm sido determinados como importantes causas, principalmente naqueles pacientes em estágio 5 e em TSR (ISEKI, 2007).

**Figura 2:** produção da Eritropoietina pelo rim e mecanismo de ação. (adaptado de Hoffbrand, 2013)



A) Produção de eritropoietina pelos rins em situação de normalidade e de doença renal. B) Ação apoptótica via caspases.

Apresenta-se inicialmente como um anemia de leve a moderada, normocítica e normocrômica. Com o decorrer do tempo pode se tornar microcítica e hipocrômica pela restrição do ferro, devido a condição inflamatória crônica, a qual determina diminuição na disponibilidade do ferro para a eritropoiese, mesmo com um ferro de depósito adequado, caracterizando uma deficiência funcional ou mesmo uma deficiência absoluta, por exaustão

nos seus estoques (HAYAT, 2009; MIRANDA, 2009; ALVES *et al*, 2015).

Um outro fator determinante de anemia em pacientes com DRC e que também não deve ser esquecido é a hemólise acelerada provocada pela presença sistêmica de toxinas urêmicas, as quais também inibem a eritropoiese de forma direta (ALVES *et al*, 2015).

### **1.1.3 Análise laboratorial da anemia**

A determinação do estado de anemia e suas prováveis causas são dependentes de investigação laboratorial, onde estão incluídos exames como hemograma completo, contagem de reticulócitos, ferro sérico, índice de saturação da transferrina, ferritina sérica, receptor solúvel da transferrina, dosagem de ácido fólico e vitamina B12, entre outros.

O hemograma é um dos exames laboratoriais mais solicitados na prática médica diária, pois, possui grande importância no rastreio, diagnóstico e monitoramento de diversas doenças. Fornece informações qualitativas e quantitativas do tecido hematopoiético ou da medula óssea, através da análise de suas células no sangue periférico (eritrócitos, leucócitos e plaquetas). Em específico, na identificação e monitoramento de estados de anemia, constitui a principal ferramenta (BRAGA, 2014).

Nos últimos anos, com o conhecimento de novas tecnologias, a automação para a realização do hemograma tornou-se realidade, trazendo consigo métodos que possibilitam utilização de menor quantidade de amostra, maior rapidez na execução e liberação do exame, menor erro com conseqüente maior credibilidade nos resultados, além, é claro, da incorporação de diversos novos parâmetros com relevantes aplicações. Isso mudou inclusive a denominação desses equipamentos de contadores de células para analisadores hematológicos (BRAGA, 2014; SILVA *et al*, 2016). No entanto, os índices hematimétricos, já existentes, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), ainda são de grande importância para a classificação das anemias em normocíticas/normocrômicas, microcíticas/hipocrômicas e macrocíticas (classificação morfológica).

A homeostase do ferro é dependente do sincronismo de absorção, utilização e do seu estoque. Constitui elemento vital em diversas funções celulares, como transporte de oxigênio, síntese de DNA e metabolismo energético. Desequilíbrios na sua homeostasia

podem acarretar tanto seu acúmulo como sua deficiência, sendo que esta última interfere de forma direta na síntese de hemoglobina e, por conseguinte, na diminuição da eritropoiese e instalação do quadro de anemia (GROTTO, 2008).

O equilíbrio homeostático do ferro é dependente, principalmente, da ação coordenada de quatro proteínas: a transferrina responsável pelo transporte, o receptor de transferrina (TfR) incumbido da sua utilização, a ferritina que está envolvida diretamente na sua estocagem e a hepcidina que controla a captação e a oferta de ferro. Por este motivo, são considerados biomarcadores laboratoriais tradicionais na avaliação da deficiência do ferro, além da dosagem do ferro sérico, dosagem da transferrina sérica, Índice de Saturação da Transferrina (IST) e ferritina sérica, sendo que os três primeiros representam o ferro sistêmico disponível e o último o estoque de ferro atual. A consolidação do uso destes marcadores se dá também pelo fato destes serem executados pela grande maioria dos laboratórios clínicos e, conseqüentemente, estarem disponíveis para o monitoramento clínico (SILVA *et al*, 2016).

A concentração da ferritina plasmática e o IST, estão longe de serem considerados os marcadores ideais de reserva e da disponibilidade de ferro, embora, poderíamos assim dizer, serem as ferramentas mais utilizadas regularmente para este fim. Porém, em especial, a ferritina sérica, merece todo o cuidado de interpretação e valorização quanto ao estoque de ferro disponível, levando-se em consideração que, nos casos de pacientes com DRC, onde a presença de inflamação crônica é um achado comum, o seu valor pode não traduzir efetivamente este entendimento, pois, a sua concentração plasmática elevada pode estar associada ao extravasamento tecidual, principalmente de apoferritina, fração de ferritina que não contém ferro e, portanto, não estar associada ao ferro de depósito atual.

Nesta situação, outros marcadores laboratoriais que traduzam o ferro disponível para a eritropoiese, sem a interferência do estado inflamatório, devem ser avaliados, entre os principais, a dosagem sérica do receptor solúvel da transferrina (sTfR) e o equivalente ou concentração de hemoglobina nos reticulócitos (CHr e RET-He). O primeiro deve ser utilizado na sua razão com a o *log* da ferritina (sTfR-F) para uma melhor avaliação do ferro disponível, sofrendo de maneira menor, também as interferências inflamatórias na concentração da ferritina. Já o segundo aparece entre os novos parâmetros hematológicos presentes no hemograma, realizado em alguns tipos de analisadores automatizados e

disponível entre os demais parâmetros usuais, como dosagem de hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos, entre outros. O equivalente ou concentração de hemoglobina nos reticulócitos circulantes demonstra, de forma precoce, atual e representativa a condição da atividade eritropoiética quanto a hemoglobinação na medula óssea (FISHBANE *et al*, 1997; PUNNONEN *et al*, 1997; THOMAS & THOMAS, 2002; CHUANG *et al*, 2003; KALANTAR, 2006; WISH, 2006; MAST *et al*, 2007; O'MARA, 2008; BESARAB, 2011; ALVES *et al*, 2015).

Na anemia de doença crônica (ADC), diferentemente da anemia por deficiência absoluta de ferro, o fator limitador da hemoglobinação dos eritrócitos e dos reticulócitos é a deficiência funcional do ferro, onde a mobilização deste é impedida, caracterizando um estoque de ferro adequado ou, até mesmo elevado, porém, ferro sérico diminuído e IST inferior a 20% (THOMAS & THOMAS, 2002).

Os reticulócitos são células precursoras eritróides, anucleadas e contendo grânulos residuais de RNA no seu citoplasma. No processo de maturação dos eritrócitos, os reticulócitos constituem o estágio que antecede imediatamente o estágio final de maturação destas células, permanecendo nesta fase por um tempo médio de 3 a 4 dias. Em torno de 98% a 99% da população de reticulócitos se encontram na medula óssea e, apenas aproximadamente 1% a 2% destes vão para a circulação periférica, ainda nesta forma. No sangue periférico possui um tempo médio de vida muito curto, entre 1 e 2 dias, principalmente quando comparado com os eritrócitos, que apresentam um *turnover* médio de 120 dias. Por este simples fato, o reticulócito constitui um sensível marcador, talvez o mais próximo, da eritropoiese em tempo real e a sua contagem tornou-se, tradicionalmente, a maneira mais utilizada neste monitoramento, expressada tanto pela contagem numérica destas células (relativa e absoluta), quanto pela capacidade atual de se medir o grau de maturidade em que migra para o sangue periférico (CHUANG *et al*, 2003; JOÃO *et al*, 2008; WOLLMANN *et al*, 2014; SILVA *et al*, 2016).

O método manual de contagem destas células, sem qualquer dúvida, é o mais utilizado na prática laboratorial. Baseia-se na observação microscópica dos grânulos, em lâmina corada com coloração supravital, utilizando-se os corantes azul de cresil brilhante ou azul de metileno novo. Mesmo sendo uma técnica de fácil execução, permitindo que seja realizada em qualquer laboratório, a contagem manual dos reticulócitos esta sujeita a uma grande variação inter e intra-observadores, devido a imperfeições do esfregaço, campos

microscópicos heterogêneos, número pequeno de células contadas inferindo erro estatístico elevado (pode ser maior que 50%), etc (GROTTO, 2008 )

Com o desenvolvimento de novas tecnologias para equipamentos hematológicos automatizados, como por exemplo, a citometria de fluxo, anticorpos monoclonais ligados a fluorocromos, corantes fluorescentes com afinidade a ácidos nucleicos (RNA ribossomal) e a dispersão do raio laser, a contagem de reticulócitos voltou a ter um grande interesse e importância. É possível hoje se obter nos analisadores hematológicos, com relação aos reticulócitos circulantes, além da contagem numérica relativa e absoluta, a segregação destas células em 3 grupos, quanto a maturidade: reticulócitos com alta fluorescência (*High Fluorescence Reticulocyte* – HFR), reticulócitos com fluorescência média (*Medium Fluorescence Reticulocyte* – MFR) e reticulócitos com baixa fluorescência (*Low Fluorescence Reticulocyte* – LFR). A soma das frações MFR e HFR constituem o parâmetro Fração de Reticulócitos Imaturos (IRF%), pois a quantidade de grânulos de RNA citoplasmático dos reticulócitos é diretamente proporcional a quantidade de fluorescência e a imaturidade. O IRF% indica a proporção de reticulócitos mais imaturos no sangue periférico e reflete atividade eritropoiética acelerada presente, como ocorre, por exemplo, na terapia com AEE, tornando-se um bom marcador no monitoramento de resposta adequada. Permite uma avaliação clínica mais precoce, pois, o IRF% se eleva mais cedo que o número total de reticulócitos circulantes, em alguns dias (TATSUMI & IZUMI, 1991; CHUANG *et al*, 2003; BUTARELLO, 2004; JOÃO *et al*, 2008; WOLLMANN *et al*, 2014; SILVA *et al*, 2016).

A denominação RET-He é específica para os equipamentos da marca Sysmex (Sysmex, Japão) (BRAGA, 2014) e pode ser considerado hoje o marcador mais sensível na identificação da deficiência do ferro, pois, permite verificar a quantidade de ferro disponível para a eritropoiese, na medula óssea, através dos reticulócitos jovens na circulação e com um antecedência de pelo menos 3 a 4 dias aos demais marcadores usados atualmente. Diferentemente, durante o desenvolvimento dos reticulócitos na medula óssea, onde ocorre a síntese crescente de hemoglobina, considera-se que a concentração da hemoglobina durante a vida média dos reticulócitos no sangue periférico seja constante, exceto em situações que provoquem mudanças estruturais nos eritrócitos, como hemólise ou fragmentação (BUTARELLO, 2004). Se observamos por este aspecto, o RET-He pode ser usado no monitoramento de pacientes com DRC, em uso de AEE e com suplementação de

ferro, quanto a dosagem adequada, pressupondo a necessidade ou não de intervenção com maior antecedência, quando comparado com marcadores como a ferritina, IST e relação sTfR-F. Além do mais, o RET-He não sofre interferência do estado inflamatório. Portanto, é muito adequada a sua utilização quando se quer avaliação rápida do uso de suplementação férrica intravenosa ou para se evitar uma sobrecarga de ferro, principalmente em algumas situações clínicas, como por exemplo, pacientes com DRC em diálise. Entretanto, este parâmetro não está disponível ainda no hemograma na maioria dos laboratórios clínicos. (BUTARELLO, 2004; NKF-KDOQI, 2006; O'MARA, 2008; ALVES *et al*, 2015).

#### **1.1.4 Tratamento da anemia na DRC**

Desde a sua introdução na prática clínica, há aproximadamente 20 anos, o uso de agentes estimuladores da eritropoese (AEE), substituíram de forma eficiente as necessidades de transfusões sanguíneas, diminuindo em muito os efeitos danosos provocados por esse tipo de terapia, tais como, sobrecarga de ferro, doenças cardiovasculares, aloimunização, hepatite B, hepatite C, HIV, entre outros. Essas drogas demonstraram melhores resultados no atingimento de metas para os valores de hemoglobina, ou seja, na correção efetiva do estado anêmico, porém, com comprovada diminuição dos efeitos adversos acima descritos e da morbidade/mortalidade, com considerável melhora na qualidade de vida e aumento da sobrevida desses pacientes (ESCHBACH *et al*, 1987; KDIGO, 2006; SOLOMON, 2010).

Entretanto, mesmo com a franca evidência de elevação dos níveis de hemoglobina com o uso de AEE em aproximadamente 90% dos casos, em 10% dos pacientes com DRC em uso de AEE e devidamente suplementados com ferro, continuam sem atingir a meta para os valores de hemoglobina desejados, determinando o que foi denominado de hiporresponsividade ou simplesmente resistência aos AEE. Embora não haja consenso para a definição de resistência aos AEE, alguns conceitos podem ser utilizados, como por exemplo: aumento progressivo da dose de AEE para a manutenção da hemoglobina alvo; diminuição significativa do valor da hemoglobina durante dose constante de AEE; falha no atingimento da taxa de hemoglobina maior que 11,0 g/dL, apesar de elevada dose de AEE; aumento da dose de AEE acima de 25%; ganho do valor da hemoglobina inferior a 0,3 g/dL

semanalmente ou inferior a 1 g/dL após 2 a 4 semanas de tratamento. (O'MARA, 2008; KANBAY *et al*, 2010; GUERRERO-RISCOS *et al*, 2012; ALVES, 2015).

Em primeiro plano a deficiência de ferro, situações de infecção e inflamação e TSR e em menor grau sangramentos ou perda de sangue, hiperparatireoidismo, toxicidade provocada pelo alumínio, deficiência de ácido fólico e vitamina B12, disfunções da medula óssea, hemoglobinopatias, uso de inibidores da ECA (enzima conversora de angiotensina) e em raros casos, a presença de anticorpos anti-EPO parecem ter importante relação com resposta terapêutica pobre. De acordo com os estudos de Kalantar-Zaleh *et al*, há um forte associação entre níveis elevados de marcadores inflamatórios com resistência a AEE (KALANTAR-ZALEH *et al*, 2003) (Figuras 6 e 7).

Em aproximadamente 50% dos pacientes com DRC, há prevalência da deficiência de ferro e, mesmo com o uso de AEE na maioria dos pacientes, a prevalência de anemia chega a 34% no Brasil (KANBAY *et al*, 2010; ALVES *et al*, 2015). Por outro lado, a presença de resistência aos AEE, mesmo na ausência dos fatores já citados, deve ser levado em consideração os aspectos relacionados à marcada variabilidade na sensibilidade individual de resposta aos AEE, facilmente caracterizada pela dificuldade de padronização da dose resposta (MACDOUGALL, 2002).

Desta forma, apesar de cada vez mais novas opções de terapia e estratégias de tratamentos, a anemia continua sendo a maior complicação de pacientes com DRC, especialmente aqueles submetidos à TSR. O sucesso no manejo da anemia esta diretamente associado a um melhor monitoramento laboratorial, com consequentes melhores resultados clínicos nestes pacientes, pois a baixa responsividade ao tratamento com AEE é um fator de risco de mortalidade independente (YAN *et al*, 2007). A incapacidade de se atingir o alvo terapêutico de 11,0 g/dL a 12,0 g/dL de hemoglobina combinado com altas doses de AEE, elevam substancialmente o risco de morte por Infarto do Miocárdio (IAM), Insuficiência Cardíaca Congestiva (ICC) ou Acidente Vascular Cerebral (AVC) (FISHBANE & BERNS, 2007; KANBAY, 2010). A determinação de dose e manutenção no uso de AEE estão baseados, atualmente, no acompanhamento dos níveis séricos de hemoglobina e da disponibilidade de ferro medida pela dosagem da ferritina sérica e do IST (BESARAB, 2011).

## **1.2. Inflamação e DRC**

A persistência de inflamação sistêmica crônica em pacientes com DRC, em estágio final e em TSR é decorrente, em parte, pela presença de comorbidades infecciosas e inflamatórias e tendo como mecanismos ativadores a toxicidade urêmica, acúmulo de proteínas modificadas (produtos de glicação avançada – AGEs), e aumento na expressão e retenção de citocinas, entre outras. As citocinas são proteínas solúveis, geralmente de baixo peso molecular, que agem em resposta a situações inflamatórias, sendo produzidas, principalmente pelos leucócitos, mas também por outras células. Na DRC, entre as citocinas pró-inflamatórias associadas à doença, destacam-se, entre outras, a Interleucina-1 (IL-1), a Interleucina-6 (IL-6), o Fator de Necrose Tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleucina-8 (IL-8), Interleucina-10 (IL-10) e o *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1). Essas citocinas agem aumentando ou diminuindo a expressão de proteínas, principalmente, receptores de membrana e moléculas de resposta inflamatória, conduzindo para um estado inflamatório crônico. (VIANNA *et al*, 2011; PECOITS-FILHO *et al*, 2003; DEL VECCHIO *et al*, 2005; COSTA *et al*, 2008; PECOITS-FILHO-(3), 2006; HAUSER *et al*, 2008; PECOITS-FILHO-(2), 2016).

A IL-6 é a principal responsável pela ativação hepática na produção de proteínas de fase aguda, como a Proteína C Reativa (PCR) e o fibrinogênio, além de promover a proliferação e diferenciação de linfócitos B e recrutamento de leucócitos. É codificada por um gene localizado no cromossomo 7, possuindo múltiplas atividades biológicas, sendo uma delas a expressão do gene HAMP (*Hepcidin Antimicrobial Peptide*), através da ativação via STAT3/Smad4 (*Signal Transducers and Activators of Transcription-3*). É dependente de receptor específico nas células (IL-6R) ou solúvel (sIL-6R). Na cavidade peritoneal impõe duas fases distintas de atividade, denominadas de precoce e tardia, sendo a primeira mediada por neutrófilos e a segunda por monócitos. O TNF- $\alpha$ , por sua vez, juntamente com a IL-1, são ativadores de *toll-like receptors* (TLRs), envolvidos na ativação da resposta imune inata, ativando a expressão de citocinas envolvidas na apoptose e no reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS), geralmente apresentados por bactérias gram-negativas e toxicidade urêmica. LPS também estimulam, através da ativação de TLR4, a produção de MCP-1 (PECOITS-FILHO *et al*, 2006; KEMMA, 2008; PIPERNO, 2009; HAUSER *et al*, 2008).

A presença de inflamação em pacientes com DRC pode ser percebida pela elevada concentração de citocinas inflamatórias, tais como, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e PCR. Essas citocinas possuem ação supressora direta sobre a eritropoiese na medula óssea, contribuindo para o quadro de anemia (PECOITS-FILHO *et al*, 2003; DEL VECCHIO *et al*, 2005; KANBAY *et al*, 2010).

A DP “*per se*” , como tratamento dialítico, determina estado inflamatório crônico, envolvendo diferentes eventos e mecanismos, como por exemplo: a) implantação no peritônio do cateter de diálise pode ser considerado como o primeiro fator pró-inflamatório associado, pois, além de induzir reação inflamatória, torna-se um importante local de desenvolvimento de biofilme bacteriano; b) bioincompatibilidade da membrana peritoneal com as soluções de diálise, por possuírem alta osmolaridade, elevada concentração de glicose e seus produtos de degradação, baixo pH, produtos de glicação avançados (AGEs), os quais determinam elevado estresse oxidativo, provocando danos às células mesoteliais e levando essas células a apoptose e, por consequência, causando exposição da membrana peritoneal por desnudamento. A formação dos AGEs também é potencializado pela presença de toxicidade urêmica, fator este que deve ser considerado também como iniciador do processo de inflamação crônica e antecessor ao início da DP, bem como, o acúmulo de proteínas modificadas, sobrecarga de volume e redução na função renal residual (PECOITS-FILHO *et al*, 2012; PECOITS-FILHO *et al*, 2007). De acordo com o trabalho de Pecoits-Filho e colaboradores, em 2006, há fortes indícios da interrelação entre inflamação sistêmica e inflamação peritoneal, onde carece de maiores estudos para se saber qual dos processos é o agente inicializador.

### **1.3 Interrelações entre inflamação e anemia**

Outro importante mediador fisiológico envolvido no estado anêmico persistente e resultante do estado inflamatório crônico em pacientes com DRC, é a hepcidina. A síntese de hepcidina é fortemente estimulada pela inflamação e pela sobrecarga de ferro. Consiste em um peptídeo com 25 aminoácidos (estrutura do maior peptídeo), produzido pelo fígado e que tem como principais funções mediar a resposta imune inata e controlar o balanço do ferro sistêmico e de depósito (Figura 3) (GANZ, 2003). A hepcidina medeia à absorção intestinal e

a liberação do ferro tanto pelos macrófagos como pelos enterócitos, sendo a sua expressão regulada de forma indireta ou direta por citocinas e proteínas inflamatórias, como por exemplo, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e PCR, as quais produzem um aumento da expressão deste peptídeo e, por conseguinte, a elevação da sua concentração plasmática. Além do aumento da expressão, a concentração sanguínea da hepcidina também está elevada pela diminuição do seu *clearance* renal. Valores plasmáticos elevados de hepcidina provocam deficiência absoluta e/ou funcional do ferro, limitando, desta forma, a sua utilização ou aproveitamento na eritropoese. (COSTA, 2008 (a)(b)(c)). De forma mais específica, a hepcidina interage com a ferroportina e com os transportadores de ferro da membrana dos enterócitos e macrófagos, regulando a captação e exportação do ferro para o sangue, ou seja, em concentrações séricas elevadas diminui a oferta de ferro na circulação, diminui a saturação da transferrina e aumenta a captação do ferro para depósito, através da ferritina (Figuras 4 e 5) (MAST *et al*, 2007; ALVES *et al*, 2015).

A diferença entre a deficiência absoluta e funcional do ferro pode ser determinada pela quantidade do ferro de depósito, medido pela dosagem sérica da ferritina, a qual se encontra elevada na deficiência funcional, porém, com IST inferior a 20% (BESARAB, 2011).

Figura 3: estrutura molecular da hepcidina, peptídeo maior (25 aminoácidos) (GANZ, 2003)

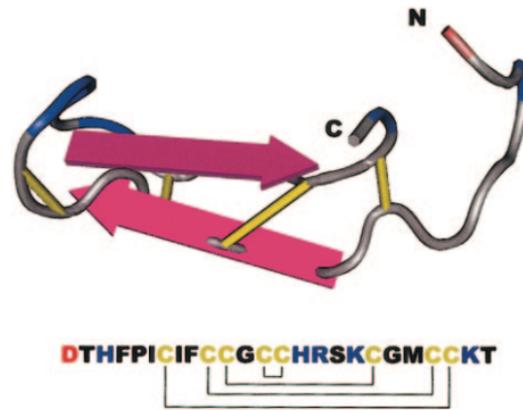
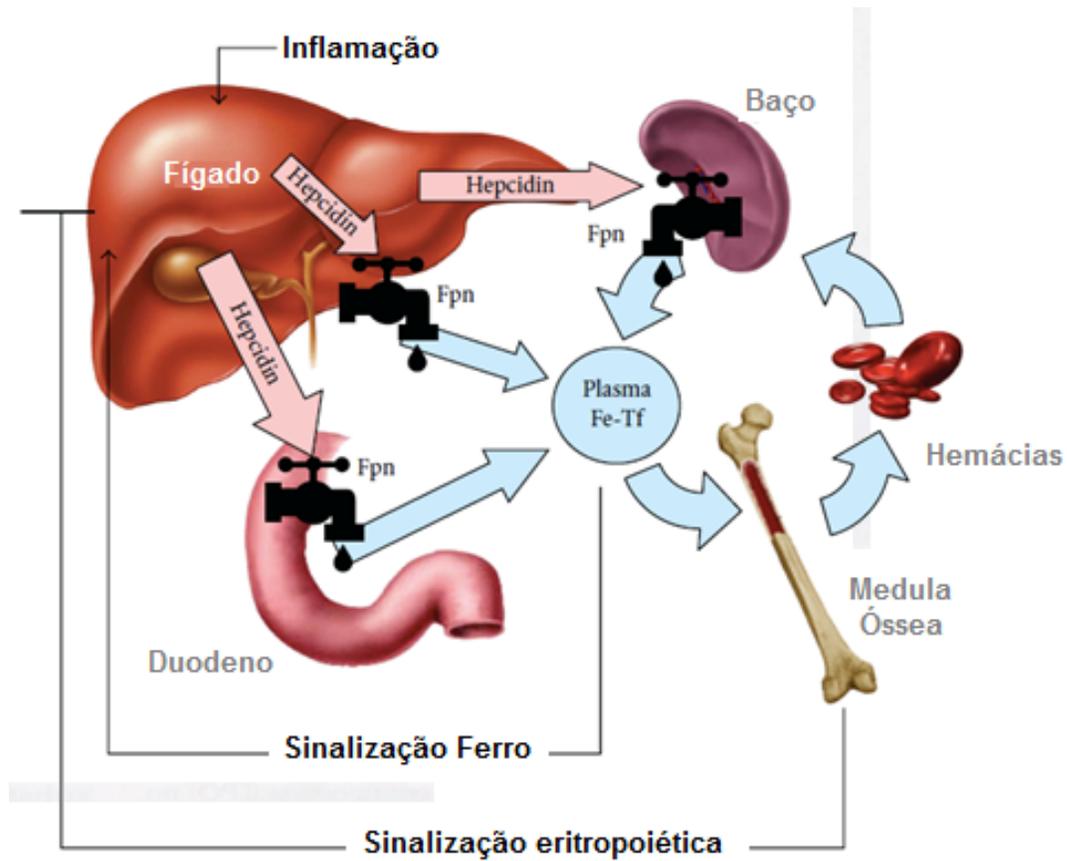
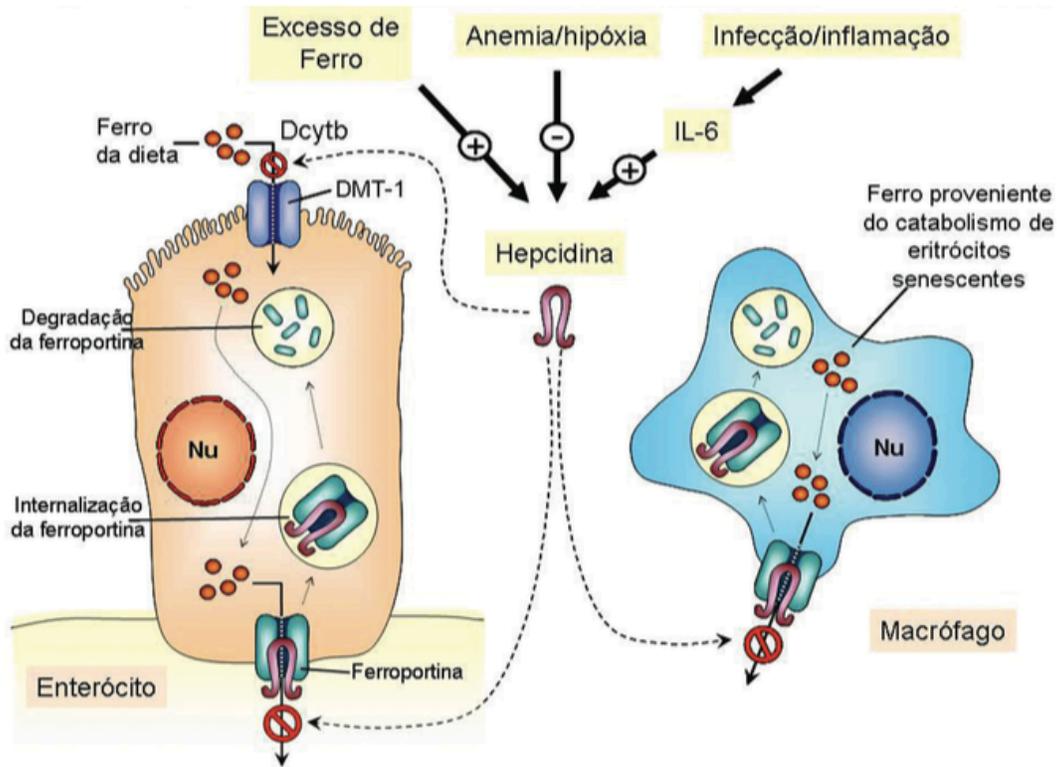


Figura 4: Ação da hepcidina no controle do *status* de ferro sistêmico. (Advances in Hematology, 2010).



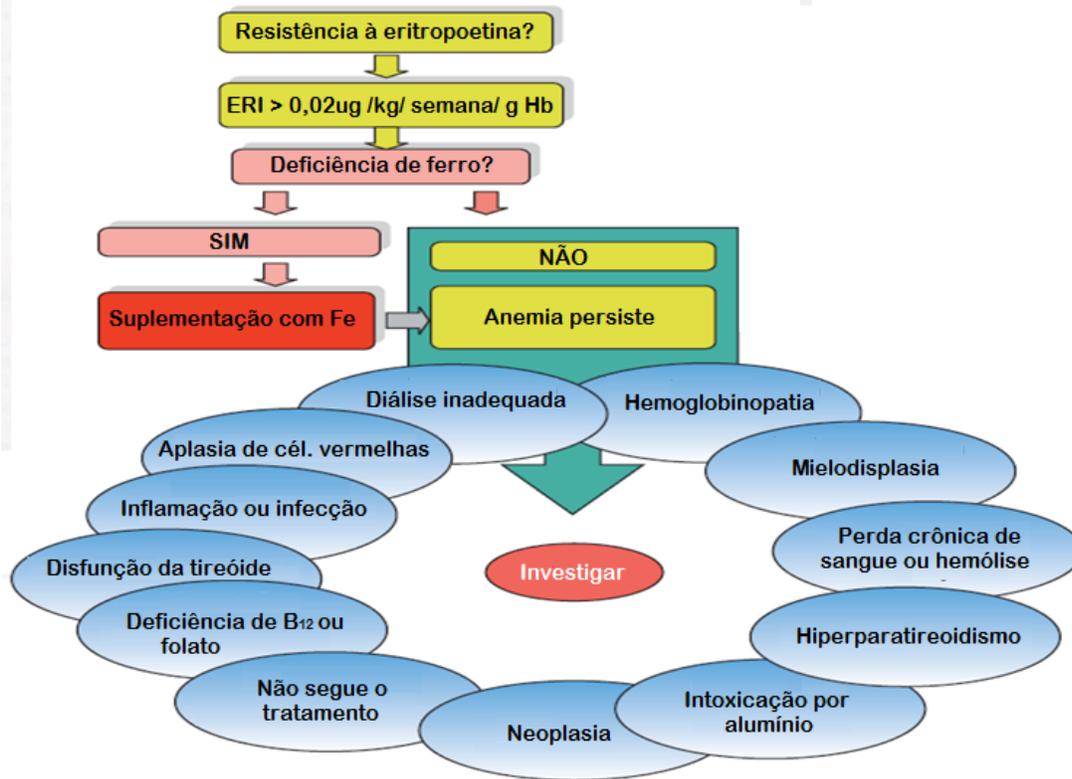
**Figura 5:** metabolismo do ferro. Controle celular e sistêmico do ferro (GROTTO, 2008)



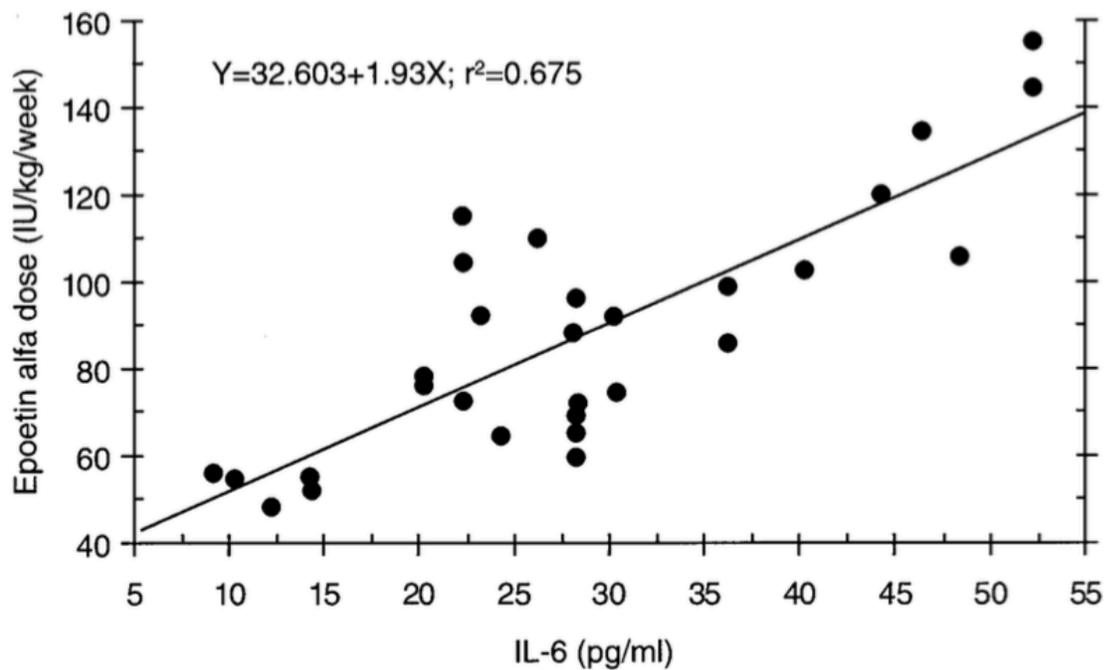
**Legenda:** Nu: núcleo; Dcytb: duodenal cytochrome b; IL-6: interleucina-6; DMT-1: divalent metal transporter-1.

Para um monitoramento mais objetivo da resposta terapêutica ao uso de AEE, foi criado o Índice de Resistência à Eritropoietina (IRE), o qual constitui um marcador opcional na aferição do grau de resistência. O cálculo do IRE é realizado pela razão da dose semanal de eritropoietina (em microgramas) pelo peso (em quilogramas) e pela hemoglobina (g/dL) do paciente (dose semanal EPO / peso / HB). É considerado com algum grau de resistência quando o resultado da razão for maior do que 0,02  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{semana}$ , sendo o IRE diretamente proporcional ao seu resultado numérico (KANBAY, 2010).

**Figura 6:** Conjunto de prováveis causas de resistência aos AEE em pacientes com DRC. (KANBAY et al, 2010)



**Figura 7:** Relação entre a dose e responsividade no uso de AEE e a concentração plasmáticas de IL-6. (Nephrol Dial Transplant, 2002).



Justifica-se o propósito deste estudo o fato da anemia ser um importante fator de morbidade e mortalidade em pacientes com DRC e em TSR. Mesmo após a introdução do uso de AEE, associado a suplementação de ferro, muitos pacientes não conseguem ou possuem dificuldades em atingir a meta para os valores de hemoglobina. Entre várias causas, a inflamação é uma das mais importantes, pois, interfere na dinâmica do ferro, ou seja, na sua disponibilização para o processo da eritropoiese, produzindo um estado de resistência aos AEE.

Para o monitoramento laboratorial da anemia e da resposta aos AEE nesses pacientes, ainda são utilizados marcadores que não possibilitam, muitas vezes, uma intervenção mais rápida e assertiva sem que se necessite maior espera e a demanda de novos exames laboratoriais adicionais. Insuficiência de dados com respeito aqueles pacientes que utilizam como TSR, a DP, levando-se em conta que a grande maioria dos artigos publicados, versam sobre pacientes em hemodiálise (CHUNG, 2013). Desta forma, o desenvolvimento deste estudo se baseou nestes fatos para determinar e analisar novos parâmetros laboratoriais de anemia presentes no relatório do hemograma de analisadores hematológicos, sem que seja necessário novas demandas ou solicitações, permitindo ao médico assistente maior agilidade assertividade de manejo junto aos pacientes com DRC e anemia.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Analisar e explorar o potencial dos parâmetros hematológicos laboratoriais reticulocitários de IRF e RET-He, no monitoramento do estado anêmico e de resistência ao uso de Agentes Estimuladores da Eritropoiese em pacientes com DRC e em Diálise Peritoneal (DP)

### **2.1 Objetivo Específicos**

- Identificar a prevalência de resistência ao uso de AEE;
- Identificar deficiência de ferro
- Identificar a presença de biomarcadores de inflamação
- Correlacionar os novos parâmetros hematológicos reticulocitários IRF e RET-He no monitoramento de anemia com aqueles já utilizados na prática clínica, para avaliação da eritropoiese e resistência.

### 3 MÉTODOS

Este estudo teve caráter prospectivo, multicêntrico, onde foram incluídos pacientes com DRC, estágio 5 e submetidos à Terapia Renal Substitutiva do tipo diálise peritoneal ambulatorial contínua (DPAC/APD), há pelo menos 30 dias, com idade superiores a 18 anos, fazendo uso terapêutico ou não de AEE e suplementar de ferro. Todos esses pacientes estavam sendo acompanhados no serviço de nefrologia do Instituto do Rim de Curitiba, estado do Paraná, Brasil. Todos os sujeitos de pesquisa leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética, sob o Parecer 357/2011, ambos documentos constantes em anexo.

Foram excluídos do presente estudo pacientes com tempo menor que 30 dias em DP, com idade inferior a 18 anos, alterações cardíacas graves (com repercussão hemodinâmica) decorrentes de doenças valvares, portadores de marcapasso, portadores de próteses ou órteses metálicas, pacientes com doença coronariana em tratamento, pacientes com diagnóstico de câncer, hepatites B ou C e HIV.

As amostras de sangue para a realização dos exames laboratoriais foram obtidas por punção venosa à vácuo e distribuídas em tubos da marca BD Vacueteiner®:

- Tubo EDTA 4,0 mL: tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico (EDTA K<sub>2</sub>), jateado na parede interna do tubo, conforme recomendação do *Clinical and Laboratory Standarts institute* (CLSI) e pelo *International Council for Standartization in Hematology* (ICSH). Foram utilizadas as amostras contidas neste tubo para a realização do hemograma.
- Tubo seco (sem anticoagulante) 10,0 mL: também denominados de tubos para soro, (não contem anticoagulante), com ativador de coágulo jateado na parede do tubo que acelera o processo de coagulação. Estes tubos também estão de acordo com as normas do CLSI e as amostras oriundas desses foram utilizadas para as determinações dos marcadores inflamatórios, Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleucina-6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1).

O hemograma foi processado no mesmo dia da coleta e em até no máximo 4 horas após e para os demais exames e também no mesmo dia da coleta, as amostras foram centrifugadas, separado o soro em várias alíquotas, as quais foram congeladas em

temperatura de -80 graus Celsius. Posteriormente, foram descongeladas e homogeneizadas momentos antes da realização dos testes. Todos os testes, não obrigatoriamente, foram realizados no mesmo tempo.

### **3.1 Hemograma**

O exame de hemograma foi realizado no laboratório de análises clínicas, setor de hematologia, do Hospital de Clínicas de Curitiba, Universidade Federal do Paraná, utilizando-se analisador hematológico automatizado da marca Sysmex, modelo XE-5000 (Sysmex, Kobe, Japão).

Para este estudo foram avaliados e utilizados do hemograma, além da dosagem da hemoglobina (HB), novos parâmetros de interesse disponíveis no equipamento Sysmex: Equivalente de Hemoglobina dos Reticulócitos (RET-He); Contagem de Reticulócitos Relativa (RET%), Contagem de Reticulócitos Absoluta (RET#); Fração de Reticulócitos Imaturos (IRF%) e suas frações (LFR%, MFR% e HFR%).

#### **Sysmex XE-5000**

O analisador XE-5000 utiliza 4 princípios para a determinação e análise de seus parâmetros, o método da impedância elétrica, a radiofrequência, a citometria de fluxo fluorescente e foco hidrodinâmico, aplicados de acordo com o parâmetro a ser observado. Por este motivo disponibiliza em seu relatório de exame, 36 parâmetros como *default* (padrão) e de forma independente da solicitação médica, determinando a presença contundente destes resultados no relatório do exame liberado para o solicitante (Tabela 3).

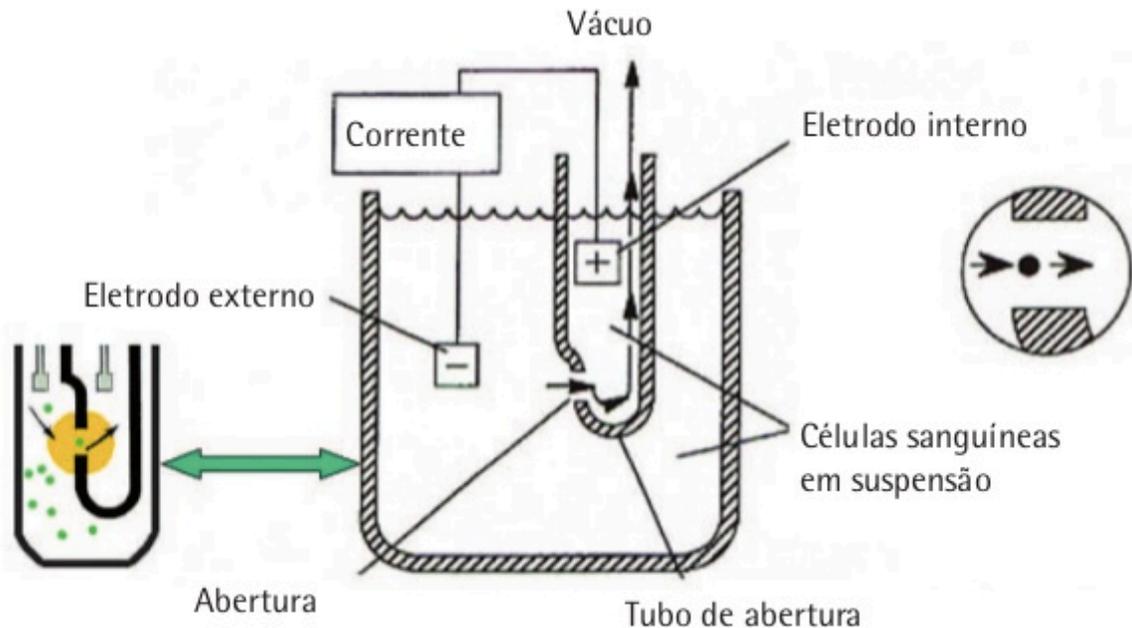
**Tabela 3:** parâmetros disponibilizados no analisador hematológico modelo XE 5000 (Sysmex)

<b>TIPO CELULAR AVALIADO</b>	<b>PARÂMETROS</b>
<b>Eritrócitos</b>	RBC, HB, HCT, VCM, HCM, CHCM, NRBC%, NRBC#, RDW-SD, RDW-CV, RET%, RET#, IRF (LFR, MFR, HFR), RET-He
<b>Leucócitos</b>	WBC, NEUT%, NEUT#, LYNPH%, LYNPH#, MONO%, MONO#, EO%, EO#, BASO%, BASO#, IG%, IG#
<b>Plaquetas</b>	PLT, VPM, PDW, PCT, IPF
<b>Células Hematopoiéticas Progenitoras</b>	HPC

Parâmetros reportados pelo equipamento XE-5000, segregados pelo tipo de célula hematopoiética avaliada. RBC: contagem de eritrócitos; HB: hemoglobina; HCT: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração da hemoglobina corpuscular média; NRBC: eritrócitos nucleadas (eritroblastos); RDW: variação do volume dos eritrócitos; RET: reticulócitos; IRF: fração de reticulócitos imaturos; LFR: reticulócitos de baixa fluorescência; MFR: reticulócitos de média fluorescência; HFR: reticulócitos de alta fluorescência; RET-He: concentração de hemoglobina nos reticulócitos; WBC: contagem de leucócitos; NEUT: neutrófilos; LYNPH: linfócitos; MONO: monócitos; EO: eosinófilos; BASO: basófilos; IG: granulócitos imaturos; PLT: contagem de plaquetas; VPM: volume plaquetário médio; PDW: variação do volume plaquetário; PCT: plaquetócrito; IPF: fração de plaquetas imaturas; % contagem relativa; #contagem absoluta.

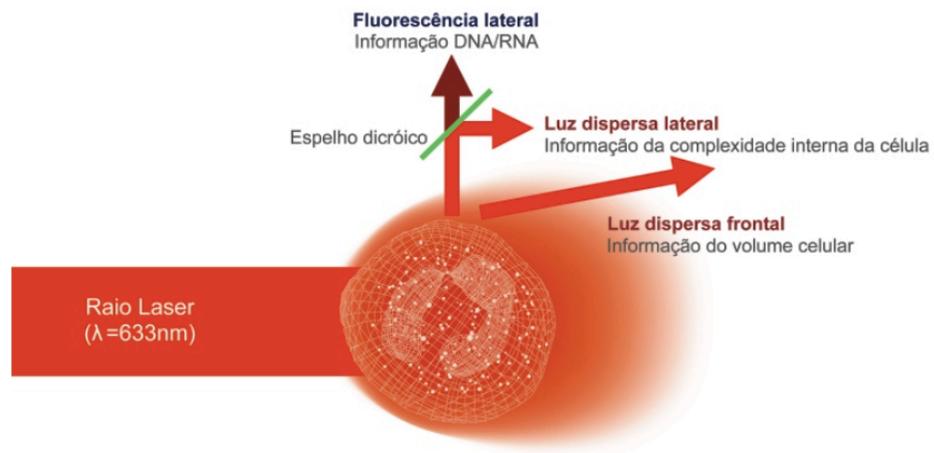
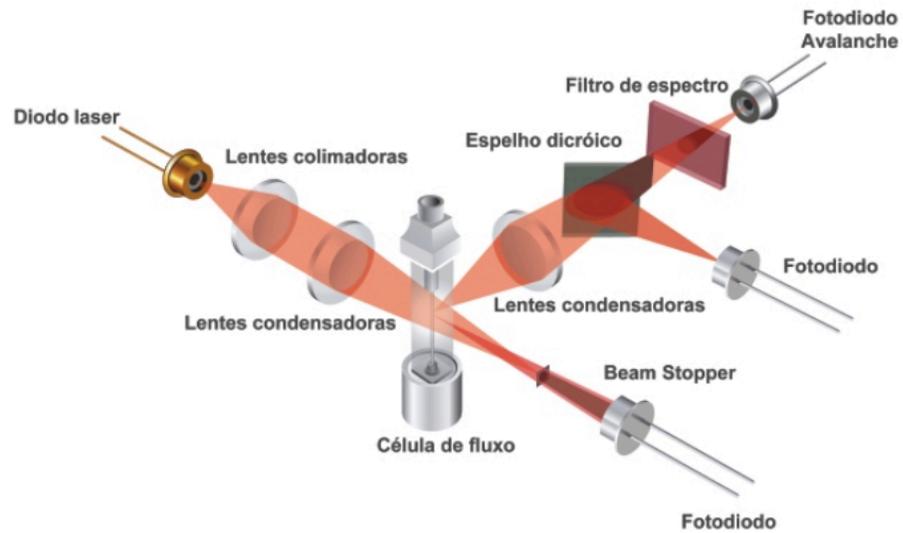
a. Impedância Elétrica e Foco Hidrodinâmico: a impedância elétrica baseia-se no princípio de que, as células sanguíneas suspensas em solução isotônica e não sendo condutoras de corrente, ao passarem individualmente por um orifício colocado entre dois eletrodos, irão gerar uma diferença de potencial o qual produzirá um pulso elétrico individual (para cada célula, um pulso criado) que também será proporcional ao tamanho desta célula. A passar pelo orifício do canal de condução forçada e entre os eletrodos, as células sofrem deformações, as quais, de certa forma, podem interferir nas medidas e nos resultados dos parâmetros analisados. Este viés é minimizado pelo uso do foco hidrodinâmico, pois, este centraliza melhor as células nesta passagem, diminuindo as interferências de forma (Figura 8). Este método, de forma geral, é utilizado nos analisadores hematológicos automatizados para os seguintes fins: contagem de leucócitos global (contagem total de leucócitos por microlitro) e diferencial de leucócitos em 3 grupos (neutrófilos, linfócitos e células médias); contagem de eritrócitos (número de eritrócitos por microlitro); VCM; determinação do volume globular (hematócrito); variação do tamanho ou volume dos eritrócitos (RDW); contagem de plaquetas (número de plaquetas por microlitro); volume plaquetário médio (VPM); variação do tamanho ou volume plaquetário (PDW) (BRAGA, 2014).

**Figura 8:** Método da impedância elétrica. Mecanismo de contagem das células (OLIVEIRA, 2014)



b. Dispersão do Raio Laser: realiza a contagem e análise das células através de um citômetro de fluxo, sobre o qual incide um feixe de luz laser ( $\lambda=633\text{nm}$ ) de forma perpendicular, provocando desvio desta luz, em diferentes e conhecidas posições ou ângulos, medidos por sensores colocados estrategicamente para este fim. Esses sensores, de acordo com a posição ou ângulo que ocupam, são denominados de: *Forward-Scattered* (FS), colocado num ângulo de 2-10 graus; *Lateral-Scattered* (LS), ângulo de leitura de 90 graus. A junção das informações do pulso elétrico criado e o ângulo de desvio do feixe de luz laser conseguem determinar a contagem de células, bem como, o tamanho e grau de complexidade desta, permitindo, desta forma, o seu reconhecimento de linhagem de origem (por exemplo, contagem diferencial dos leucócitos) (Figura 9).

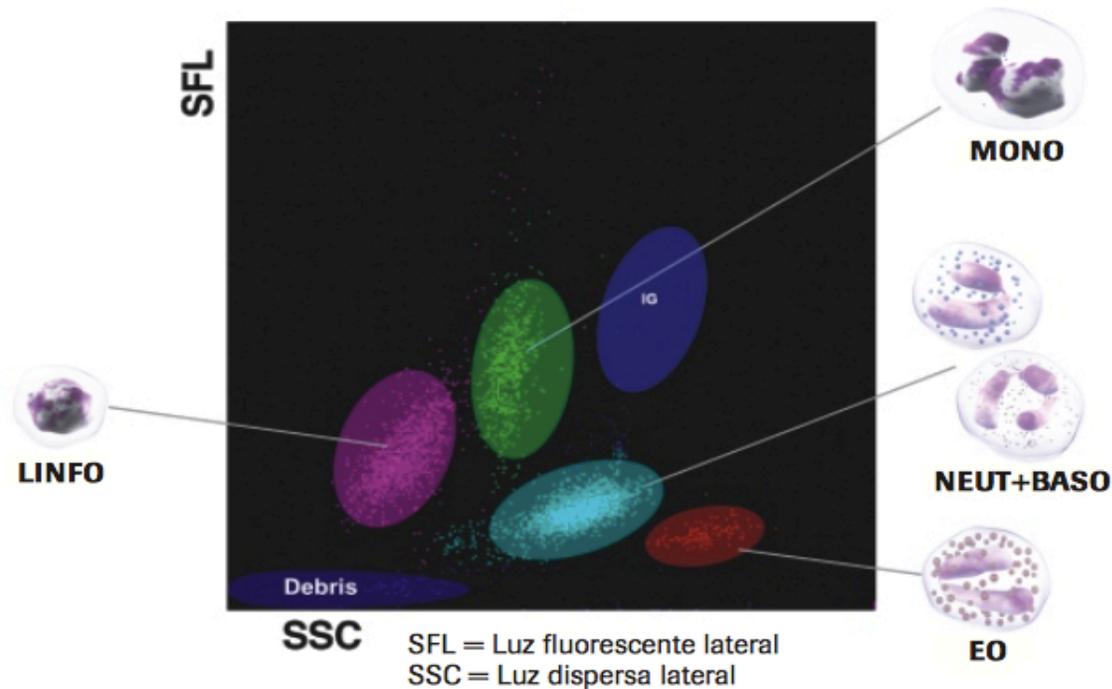
**Figura 9:** diagrama do processo de dispersão da luz laser. Citometria de fluxo com ângulos de dispersão do raio laser, determinando o tamanho e o grau de complexidade da célula (Sysmex, Kobe, Japão)



c. Radiofrequência: corrente eletromagnética de alta frequência, dependente da estrutura interna da célula, incluindo relação núcleo-citoplasmática (relação N/C), número e tipo de grânulos e densidade nuclear (BACALL, 2009).

d. Citometria de Fluxo Fluorescente: combina uma polimetina fluorescente que se liga a ácidos nucleicos (DNA no núcleo e RNA no citoplasma), que associada à dispersão do raio laser em ângulo de 90 graus, caracteriza a *Lateral-Fluorescent-Light* (LFL) (Figuras 9 e 10).

**Figura 10:** citometria de fluxo fluorescente (Sysmex, Kobe, Japão)



Desta forma o equipamento Sysmex XE-5000, utiliza para a análise dos seus parâmetros: *Fluorescent Flow Cytometry* (citometria de fluxo com fluorescência – FFC), RF-DC (radiofrequência e corrente direta), *DC-Shath-Flow* (corrente direta com impedância elétrica) para a determinação das células e *SLS-Method* (laurel-sulfato de sódio) para a determinação da concentração de hemoglobina (Tabela 4).

**Tabela 4:** Relação entre parâmetros e métodos utilizados no XE 5000 (Sysmex)

MÉTODO	PARÂMETRO
Fluorescent Flow Cytometry	WBC-Diff; IG; NRBC; RET; IRF;
RF-DC method	HPC
DC-Shath-Flow	WBC, PLT; RBC, HCT
SLS-Method	HB

WBC-Diff: contagem diferencial dos leucócitos; RF-DC: radio frequência e corrente direta; SLS-Method: Método de Lauril-Sulfato de Sódio; DC-Shath-Flow: corrente direta com impedância; IG: granulócitos imaturos; NRBC: nucleated red blood cells; RET: reticulócitos; IRF: fração de reticulócitos imaturos; HPC: células troncos hematopoiéticas; WBC: contagem de leucócitos; PLT: contagem de plaquetas; RBC: contagem de eritrócitos; HCT: hematócrito; HB: hemoglobina.

## Reticulócitos

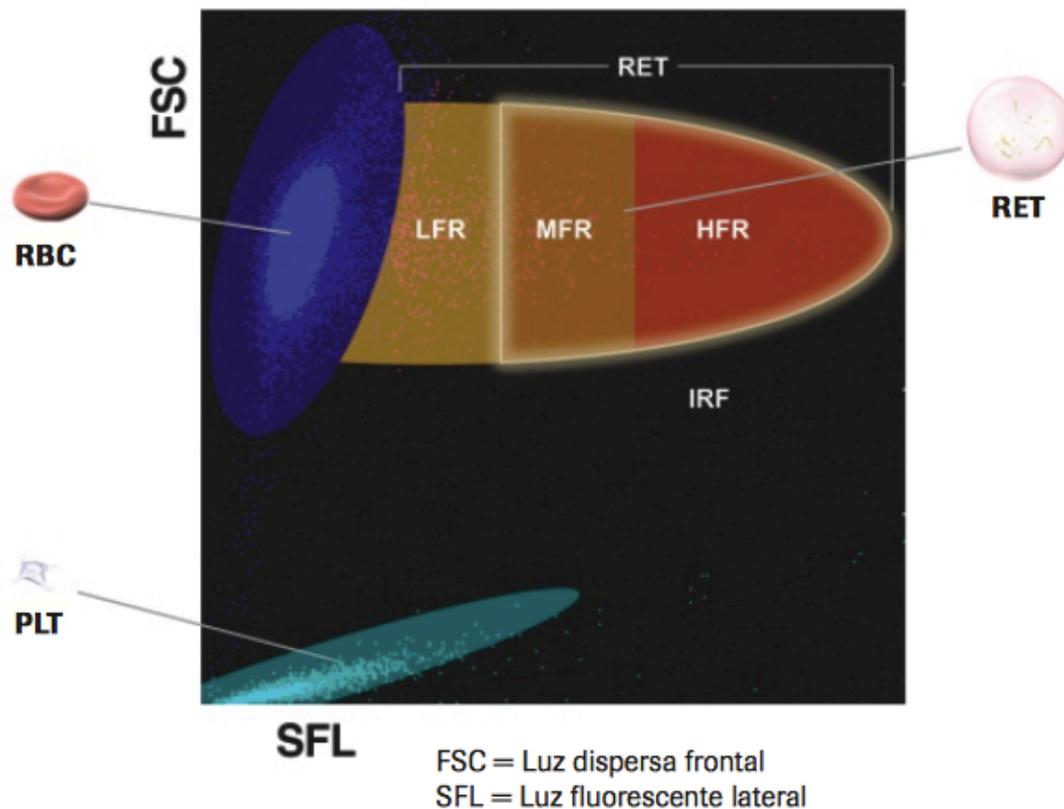
Como colocado anteriormente, para os reticulócitos foram utilizados os parâmetros: Contagem de Reticulócitos Relativa (RET%), Contagem de Reticulócitos Absoluta (RET#); Fração de Reticulócitos Imaturos (IRF%) e Equivalente de Hemoglobina dos Reticulócitos (RET-He).

O método utilizado para a contagem e avaliação dos reticulócitos no equipamento Sysmex XE-5000 (Sysmex, Kobe, Japão) é a citometria de fluxo com fluorescência, considerado “*Gold Standard*” para este fim, onde é disponibilizado um canal específico para reticulócitos, possibilitando maior acurácia nas contagens relativas e absolutas destas células, identificação do grau de maturidade e proporção dos reticulócitos imaturos circulantes, bem como, a concentração de hemoglobina dos reticulócitos. Este último representa uma medida indireta da disponibilidade de ferro para a eritropoiese com antecedência média de 2 a 3 dias.

O IRF% também é estratificado como de baixa (*Low Fluorescence Reticulocyte - LFR*), média (*Medium Fluorescence Reticulocyte - MFR*) e alta fluorescência (*High Fluorescence Reticulocyte - HFR*), sendo que o seu valor é a somatória de MFR e HFR e determina o percentual de reticulócitos com imaturidade entre os reticulócitos circulantes no sangue periférico, ou seja, aqueles que são liberados mais precocemente da medula óssea. Indica, da mesma forma o que determina a contagem de reticulócitos relativa e absoluta, qual é a situação da eritropoiese na medula óssea em tempo real, caracterizando em situações de anemias, responsividade medular ou não, porém, com maior precocidade, pois,

antes do aumento do número de reticulócitos circulantes, haverá um aumento da proporção de reticulócitos imaturos (IRF%). O fator que determina a imaturidade dos reticulócitos é a quantidade de grânulos (RNA) presente no seu citoplasma, tendo uma relação diretamente proporcional a sua quantidade (Figura 11).

**Figura 11:** fluorescência para contagem de reticulócitos totais, IRF, LFR, MFR e HFR (Sysmex, Kobe, Japão)



LFR: *Low Fluorescence Reticulocyte*; MFR: *Medium Fluorescence Reticulocyte*; HFR: *High Fluorescence Reticulocyte*; IRF: Fração de Reticulócitos Imaturos; RET: reticulócitos; RBC: eritrócitos (*red blood cells*); PLT: plaquetas.

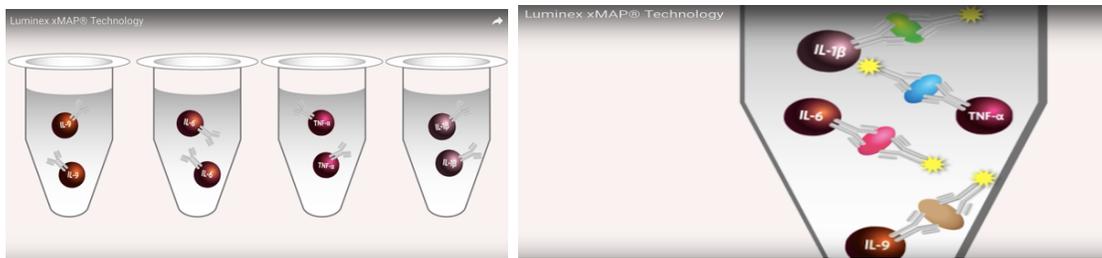
### 3.2 Citocinas Inflamatórias

Os marcadores de inflamação utilizados neste estudo foram as seguintes citocinas inflamatórias: Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleucina-6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1).

A determinação dessas citocinas foram realizados no laboratório multiuso do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Escola de Medicina da Pontifícia

Universidade Católica do Paraná, através do sistema Luminex® *Multiplexing Instruments* (Luminex® xMAP® Technology, para *screening* de até 100 antígenos (biomarcadores e proteínas), numa única amostra. O Luminex® xMAP® Technology baseia-se na utilização de microesferas de poliestireno, de 6,45 µm de diâmetro, coloridas e cobertas com anticorpos específicos para antígenos que se queira identificar. Após a ligação com o antígeno é adicionado anticorpo ligado a biotina e a reação é terminada incubando-se com streptavidina, a qual completa a reação na superfície da microesfera. As microesferas são captadas magneticamente em uma mesa, formando uma única camada (*monolayer*) onde ocorre a incidência de 2 feixes de luz laser, sendo que, um deles (vermelho – 635 nm)) irá identificar a concentração interna de corante da microesfera e o segundo (verde – 535 nm) que irá quantificar as reações dos antígenos presentes (Figuras 12, 13 e 14).

**Figura 12:** Método Luminex®



Esquerda: reação de antígenos e anticorpos nas esferas. Direita: mecanismo Laser de leitura, citometria de fluxo.

**Figura 13:** etapas do processo de reação e leitura (Luminex®)

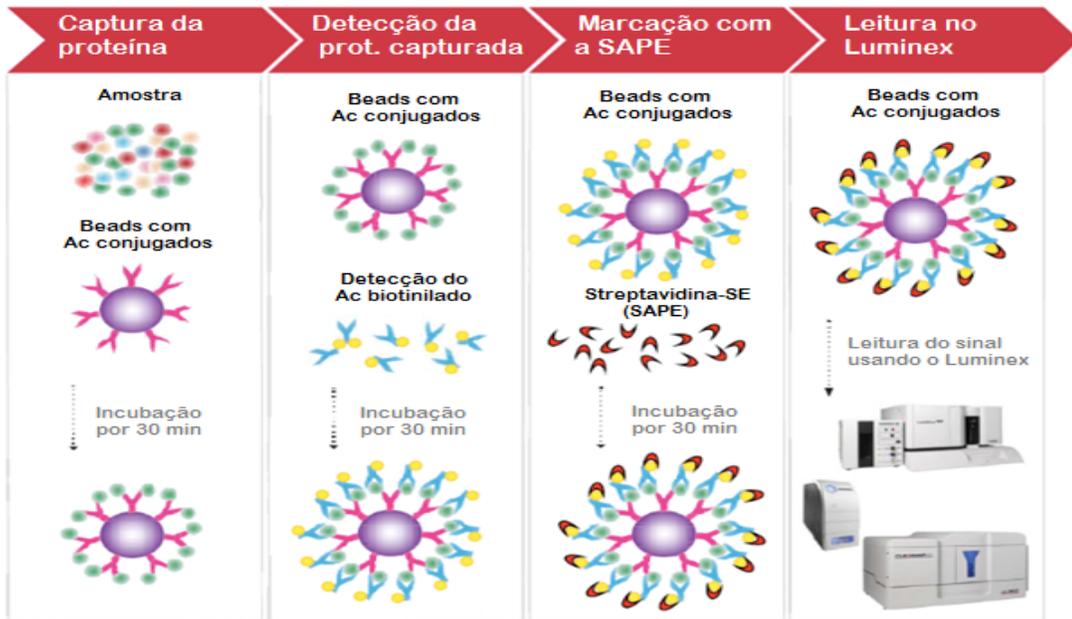
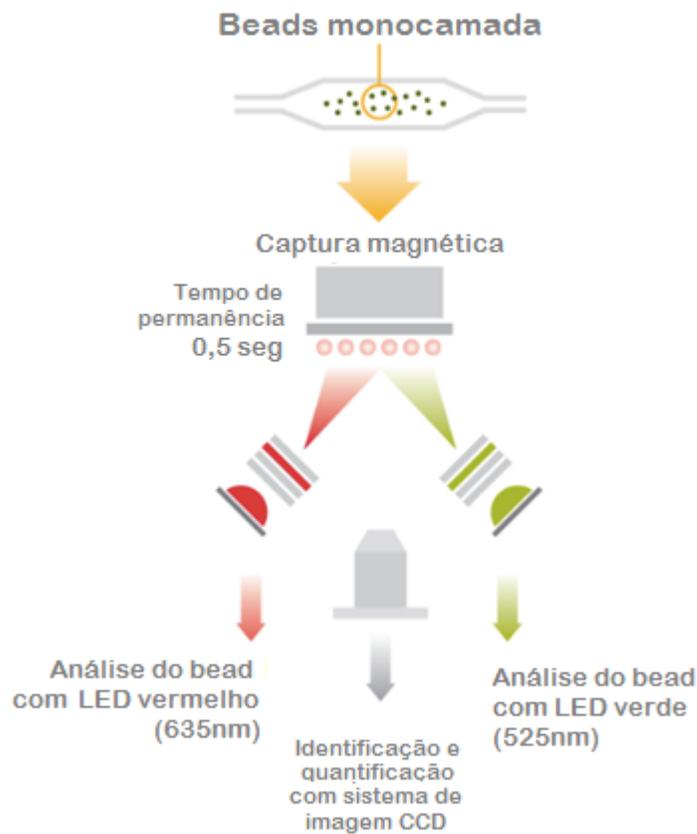


Figura 14: mecanismos magnético de leitura em monocamada, Luminex®

### Análise baseada em LED



### **3.3 Dados Demográficos e Clínicos:**

Foram levantados dos prontuários dos participantes dados demográficos e clínicos de interesse do estudo: gênero, idade, causa da DRC, tempo de diálise peritoneal, peso, altura, pressão arterial sistólica e diastólica, uso de AEE e posologia, Ferritina, Índice de Saturação da Transferrina (IST%), dosagem da hemoglobina (HB). Para os valores da dose de EPO, Ferritina, IST, e HB, foram utilizados os resultados dos últimos 6 meses, tendo como referência a data da colheita dos exames laboratoriais acima citados.

### **3.4 Tratamento Estatístico**

Os resultados obtidos das variáveis do estudo foram descritas por frequências e percentuais (variáveis categóricas) ou por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos, quartis e desvios padrões (variáveis quantitativas). Para avaliação da associação entre duas variáveis quantitativas foram estimados os coeficientes de correlação de Pearson ou de Spearman. A comparação entre dois grupos definidos pela IRE foi feita usando-se o teste *t* de Student para amostras independentes ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilks. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análises descritivas gerais das variáveis na população estudada

Trinta e cinco pacientes foram incluídos no estudo. As análises descritivas gerais do estudo, observando-se os dados demográficos, clínicos e laboratoriais, estão descritas na tabela 5.

**Tabela 5:** Características gerais da população estudada

Variável	
Idade (anos)	59,7 ± 13,4
Gênero masculino	51,4%
Causas de DRC	
Diabete Mellitus	42,9%
Rins Policísticos	8,6%
Nefroesclerose	8,6%
Outras Causas	40,0%
Tempo de Diálise (meses)	32,8 ± 30,5
APD	100%
IMC	27,4 ± 4,9
Uso de AEE	67,6%
Dose AEE	6223 ± 3525 (UI/semana) 51,7 ± 29,3 (µg/semana)
IRE ( AEE/PESO/HB)	0,071 ± 0,039 (µg)
IRE > 0,02 µg	86,9%
Hemoglobina	12,2 ± 2,0 (g/dL)
Hemoglobina < 11,0 g/dL	32,4%
Ferritina	277,5 ± 272,7 (µg)
IST	32,5 ± 10,7 (%)

Legenda: APD (Diálise Peritoneal Ambulatorial Contínua); IMC: Índice de Massa Corporal; AEE – agente estimulador da eritropoiese, DRC: Doença Renal Crônica. IRE – índice de resistência a eritropoietina, IST: Índice de Saturação da Transferrina.

### 4.2 Análises deficiência de Ferro utilizando Ferritina, IST e RET-He

Para análise da deficiência de ferro depósito e do ferro plasmático disponível, foram utilizados os parâmetros de ferritina, IST% e RET-He, sendo os 2 primeiros calculada a

média dos últimos 6 meses e o RET-He aferido das amostras tomadas para a realização do hemograma. Os valores de corte utilizados para cada um dos parâmetros referidos, foram os critérios propostos pelo KDIGO (2012), sendo inferior a 500 µg/L para ferritina, inferior ou igual a 30% para IST e menor que 29,0 pg para RET-He.

Os resultados encontrados para deficiência de ferro de depósito estão descritos na tabela 6.

**Tabela 6:** deficiência da disponibilidade e do ferro de depósito, utilizando-se os parâmetros Ferritina, IST% e RET-He

Deficiência de Ferro	n	
Ferritina < 500 µg	28	82,1%
IST ≤ 30%	29	51,7%
RET-He < 29,0 pg	34	11,8%

Legenda: IST: índice de saturação da transferrina; RET-He: equivalente de hemoglobina nos reticulócitos.

### 4.3 Análises da resistência a eritropoietina

O Índice de Resistência à Eritropoietina (IRE) foi uma das variáveis analisada, a qual foi calculada dividindo-se a dose semanal média dos últimos 6 meses de EPO usada em microgramas para cada indivíduo (restrita aos pacientes que estavam utilizando EPO), pelo seu peso (Kg) e hemoglobina (HB), também em valores médios dos últimos 6 meses (EPO semanal / peso / HB). Na população estudada, 23 indivíduos faziam o uso de AEE, para os quais foram calculados os valores de IRE e tiveram como resultado, média de 0,071 µg (± 0,039) e o valor do 3<sup>o</sup> quartil igual a 0,102 µg.

Segundo o KDIGO, 2012, pode ser considerada resistência a EPO, valores de IRE maiores que 0,02 µg, que compreendeu 86,9% (20/23) dos indivíduos analisados em nosso estudo. Porém, se compararmos os valores de IRE iguais ou maiores para o 3<sup>o</sup> quartil, que foi de 0,102 µg, contra os demais quartis, 30,5% (7/23) dos pacientes se encontram nesta situação.

Pode-se perceber também diferença significativa entre os valores para RET-He, quando considerado o 4<sup>o</sup> quartil de IRE contra os demais quartis (p<0,05).

#### 4.4 Análise comparativa da atividade eritropoiética por RET# e IRF% e IRE

A proposta principal do nosso estudo, foi avaliar a atividade eritropoiética da medula óssea, através dos parâmetros de reticulócitos, incluídos, RET%, RET#, IRF%, LFR%, MFR% e HFR% e RET-He, cujos resultados estão colocados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Valores encontrados para contagens de reticulócitos. RET%, RET#, IRF%, RET-He.

Variável	n	Média
RET%	34	1,49 ± 0,55
RET#	34	56585 ± 16367
IRF%	34	9,22 ± 5,51
LFR(%)	34	90,8 ± 5,5
MFR(%)	34	8,19 ± 4,66
HFR(%)	34	1,03 ± 0,95
RET-He (pg)	34	34,0 ± 4,8

Contagem relativa de reticulócitos; RET#: contagem absoluta de reticulócitos; IRF%: fração de reticulócitos imaturos; LFR(%): fração de reticulócitos com baixa fluorescência; MFR(%): fração de reticulócitos com média fluorescência; HFR(%): fração de reticulócitos de alta fluorescência; RET-He: equivalente de hemoglobina nos reticulócitos.

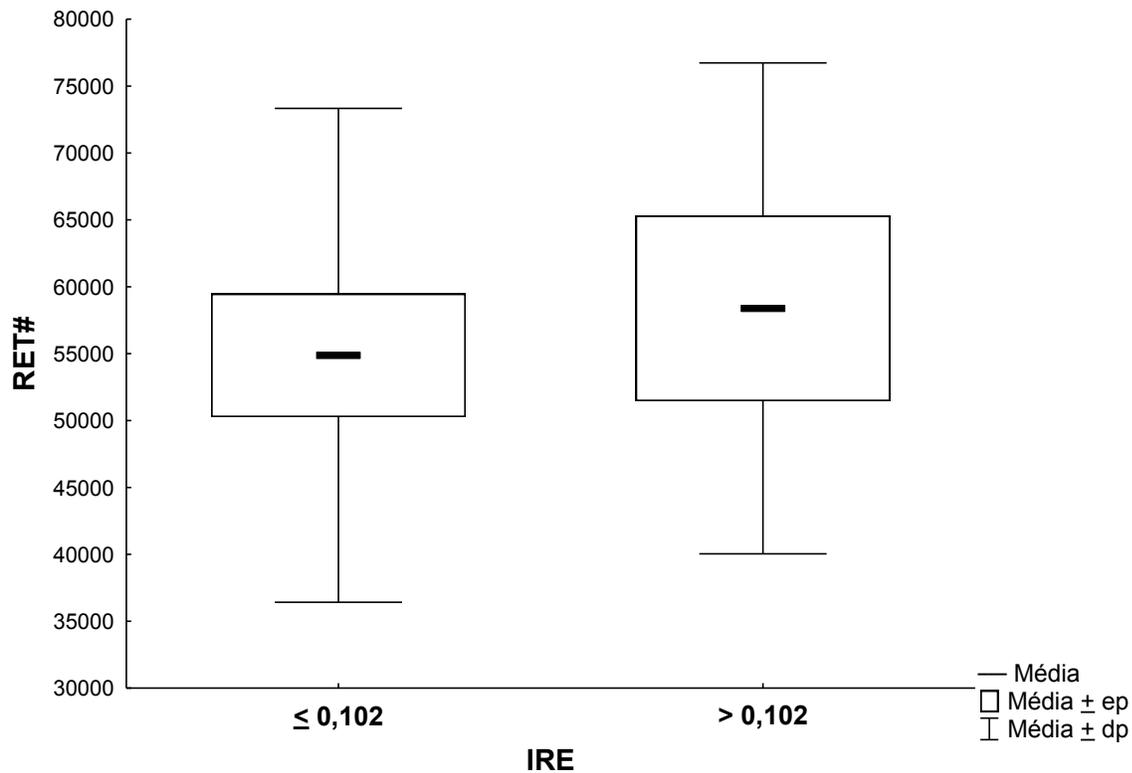
Para cada uma das variáveis de reticulócitos, testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais nos dois grupos, definidos pelo 4<sup>o</sup> quartil do IRE ( $\leq 0,102$  ou  $>0,102$ ), versus a hipótese alternativa de que as médias são diferentes. Houve diferença significativa para as variáveis IRF%, MFR% e LFR% ( $p < 0,05$ ) (Tabela 8, Figuras 15 e 16).

**Tabela 8:** valores encontrados para contagens de reticulócitos. RET%, RET#, IRF%, RET-He.

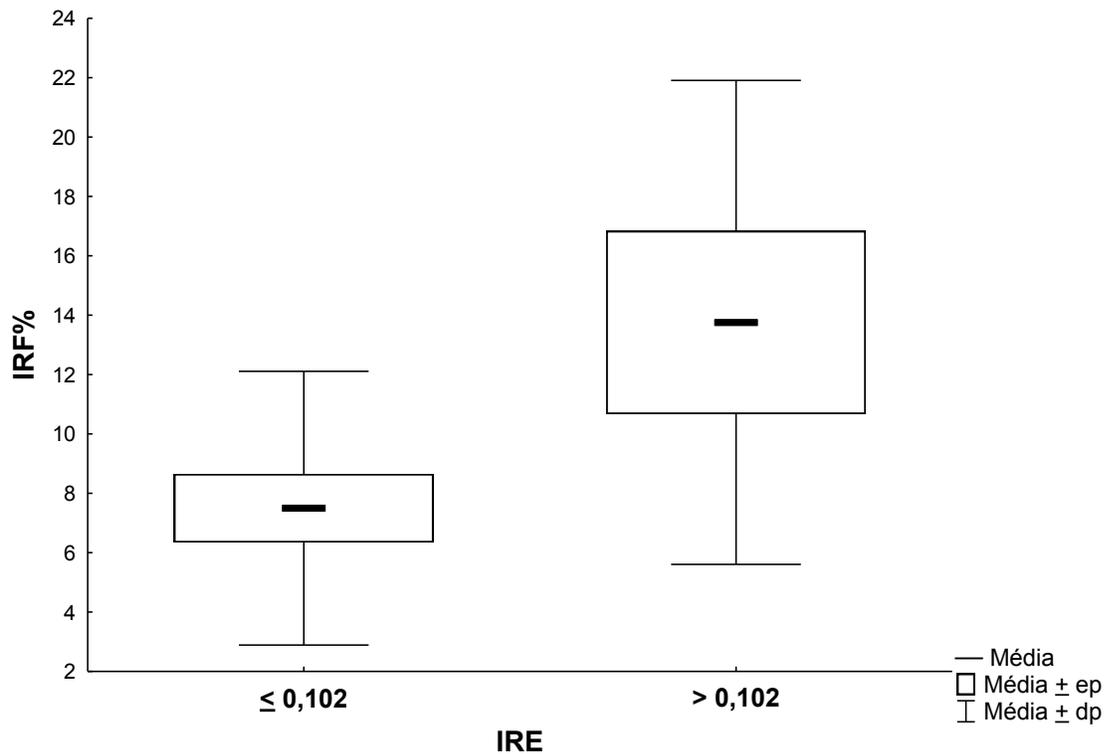
Variável	IRE (corte pelo 4º quartil)	n	Média	4o quartil	Valor de p*
RET%	≤ 0,102	16	1,53 ± 0,58	1,90	0,766
	> 0,102	7	1,45 ± 0,64	2,04	
RET#	≤ 0,102	16	54875 ± 18457	67800	0,678
	> 0,102	7	58386 ± 18350	74900	
IRF%	≤ 0,102	16	7,50 ± 4,61	11,45	0,028
	> 0,102	7	13,76 ± 8,15	21,10	
LFR(%)	≤ 0,102	16	92,50 ± 4,61	96,40	0,028
	> 0,102	7	86,24 ± 8,15	95,00	
MFR(%)	≤ 0,102	16	6,66 ± 3,91	10,05	0,030
	> 0,102	7	11,86 ± 6,87	18,30	
HFR(%)	≤ 0,102	16	0,84 ± 0,79	1,65	0,076
	> 0,102	7	1,90 ± 1,35	3,00	

\*Teste t de Student para amostras independentes (RET% , RET#, IRF%, LFR% e MFR%, HGFR%) ou teste não-paramétrico de Mann-Whitney, (p<0,05).

**Figura 15:** Análise considerando RET# e IRF% e ponto de corte 3º quartil IRE (0,102).



**Figura 16:** Análise considerando RET# e IRF% e ponto de corte 3º quartil IRE (0,102).



#### 4.5 Análise inflamação por biomarcadores e IRE

Foram utilizados no estudo, como biomarcadores inflamatórios, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 e TNF- $\alpha$ , cujos valores encontrados de cada amostra, sem exceção, estavam acima do valor máximo de referência reportado para cada biomarcador (Tabela 9).

**Tabela 9:** Resultados dos biomarcadores inflamatórios analisados no estudo.

Variável	n	Média	% > VR Máximo
IL-1 $\beta$	34	17,6 $\pm$ 5,0	100%
IL-6	34	33,8 $\pm$ 40,5	100%
MCP-1	34	492,9 $\pm$ 165,1	100%
TNF- $\alpha$	34	33,6 $\pm$ 11,9	100%

IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$  (VR: <5,0 pg/mL); IL-6: interleucina-6 (VR: <3,4 pg/mL); MCP-1: *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (VR: 43,4 – 156 ng/mL para homens e 29,2 – 138,5 ng/mL para mulheres, ambos para idade maior que 18 anos); TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral-alfa (VR: < 8,1 pg/mL). VR: valores de referência.

A IL-6, entre todas, foi a que apresentou correlação com os parâmetros de reticulócitos, utilizados como marcadores de atividade eritropoiética, sendo que para o parâmetro LFR%, a correlação foi inversa (Tabela 10).

**Tabela 10:** Análise de correlação entre IL-6 e atividade eritropoiética.

Variáveis	n	Coefficiente de correlação	Valor de p
RET% x IL-6	23	0,14*	0,520
RET# x IL-6	23	0,36*	0,093
IRF% x IL-6	23	0,39*	0,062
LFR(%) x IL-6	23	-0,39*	0,062
MFR(%) x IL-6	23	0,45*	0,030
HFR(%) x IL-6	23	0,21*	0,344

\*Coeficiente de correlação de Spearman

#### 4.6 Análise de correlação entre IRF% e valores de hemoglobina

Na Tabela 11 estão postados os resultados de análise de comparação entre as variáveis IRF% e HB (atual, 60 e 180 dias após a HB atual), quando considerados como corte os valores para IRF%  $\leq 10,5$  e  $> 10,5$ .

**Tabela 11:** Análise de correlação entre valores de HB e IRF%, considerando valores  $\leq 10,5$  e  $> 10,5$

Variável	IRF%	n	Média	Valor de p*
Hemoglobina (atual)	$\leq 10,5$	21	12,8 $\pm$ 2,1	0,029
	$> 10,5$	13	11,3 $\pm$ 1,4	
Hemoglobina pg/dL - 60d	$\leq 10,5$	17	12,7 $\pm$ 2,0	0,045
	$> 10,5$	11	11,6 $\pm$ 0,7	
Hemoglobina pg/dL - 180d	$\leq 10,5$	11	13,0 $\pm$ 2,7	0,020
	$> 10,5$	8	11,1 $\pm$ 1,3	

\*Teste t de Student para amostras independentes (HB pg/dL – 60 e 180 dias após) ou teste não-paramétrico de Mann-Whitney,  $p < 0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO

A anemia é uma complicação precoce e frequente em pacientes com DRC, mas, com maior prevalência naqueles em diálise e, segundo vários estudos, de Besarab (2011), Bevilacqua & Canziani (2007), Hayat (2009), entre outros, esta associada a elevada morbidade e mortalidade, além de um importante impacto na qualidade de vida. Embora seja já bem descrito pela literatura que a anemia da DRC tem como causa primária a deficiência de EPO, de acordo com Weiss & Goodnough (2005), estão também envolvidos os distúrbios da homeostasia do ferro e outros nutrientes. Recentemente também a resistência ao tratamento com estimulantes da eritropoiese foi identificada como uma importante causa de anemia em DRC. Nestes casos a inflamação está intimamente associada a esta condição clínica. As ferramentas clínicas e laboratoriais utilizadas atualmente para o diagnóstico e monitoramento do tratamento da anemia da DRC tem limitações na identificação de condições associadas a uma má resposta ao tratamento, abrindo oportunidades de investigação de novas estratégias nesta área. No presente estudo analisamos o potencial de novas metodologias laboratoriais em hematologia aplicadas a anemia da DRC.

Por se tratar de situação clínica diferenciada, os valores adequados ou designados de meta de HB, em pacientes com DRC e em diálise, propostos pelo KDIGO (2006 / 2012), por Bergman e Pecoits-Filho (2006) e por Alves *et al* (2015), devem estar entre 11,0 e 12,0 g/dL, não superior a 13,0 g/dL. Em nosso estudo a HB média atual foi de 12,2 g/dL ( $\pm 2,0$ ), valor este muito próximo ao encontrado por Guerreiro-Riscos (2012), que foi de 12,0 g/dL ( $\pm 1,5$ ). 32,4% (11/34) dos indivíduos que participaram do estudo, tiveram HB < 11,0 g/dL, indo de encontro com os achados de Alves *et al* (2015) que foi de 34%, estudo este também realizado em pacientes com DRC em diálise (HD) e de Gonçalves & Pecoits-Filho (2013), cujo valor encontrado foi de 38%, em população análoga. No entanto, foi inferior ao afirmado por Kanbay *et al* (2010), que coloca que em torno de 90% de pacientes com taxa de filtração glomerular inferior a 25 – 30 ml/min têm anemia. Em geral, a população estudada parece representar uma típica população clinicamente estável em dialise peritoneal, portanto adequada para o estudo da anemia e novas perspectivas diagnósticas.

Primeiramente, abordamos o componente hematológico da avaliação das reservas de ferro. Kanbay *et al* (2010) e Alves *et al* (2015), observaram que, em aproximadamente 50%

dos pacientes com DRC, há prevalência da deficiência de ferro. Embora a ferritina ainda seja usada como principal marcador do ferro de depósito, de acordo com Piva *et al* (2014), por ser uma proteína de resposta inflamatória aguda, sua concentração pode estar muito elevada, em situações específicas, muitas vezes às custas de apoferritina, não refletindo necessariamente nestes casos, o quantitativo de ferro ligado à proteína. O IST é o biomarcador mais utilizado para avaliação da disponibilidade sistêmica do ferro. No entanto, nas anemias de doenças inflamatórias crônicas, na qual se encaixa a anemia da DRC, os seus valores podem se encontrar superestimados, pois, embora a concentração do ferro plasmático esteja diminuída, também pode ocorrer a diminuição sérica do seu transportador, a transferrina, mexendo de forma direta na proporção da saturação desta última. Por este motivo, tem-se estimulado a descoberta e o uso de novos marcadores laboratoriais de ferro, que não sofram influência da inflamação e que possam refletir o real *status* de ferro disponível. Vários estudos (ALVES *et al*, 2015; CHUANG *et al*, 2003; BUTARELLO *et al*, 2004) têm mostrado o RET-He como um marcador, com boa sensibilidade e precocidade, frente aos marcadores usados rotineiramente, para avaliação da deficiência funcional de ferro, ou seja, da disponibilidade deste para a eritropoiese com antecedência de pelo menos 3 a 4 dias. A concentração de hemoglobina nos reticulócitos reflete síntese recente desta em precursores eritróides na medula óssea e, quando se encontra dentro dos valores de referência, reflete estoque e disponibilidade adequada de ferro. Oportunamente, também pode ser útil no manejo da reposição de ferro intravenoso, evitando a sua sobrecarga, a qual possui efeito cardiovascular danoso. Além do mais, o RET-He faz parte dos parâmetros do hemograma realizado por alguns analisadores hematológicos, sendo apresentado todas as vezes em que este último for feito, como por exemplo, para avaliação da hemoglobina, sem qualquer custo e necessidade adicional de solicitação.

Para a avaliação do *status* de ferro em nosso estudo, motivado pelo número reduzido de artigos publicados que referenciam especificamente pacientes com DRC em DP, foi realizado estudo comparativo entre ferritina, IST% e RET-He, sendo este último o foco do estudo. Algumas são as propostas para a determinação do valores de referência ou de corte para RET-He. Pekelharing *et al* (2010) e Canals *et al* (2005), avaliando população saudável sugeriram valores de 32,1 a 38,8 pg e de 31,9 a 34,9 pg, respectivamente. No entanto, o valor de corte proposto pelo NKF-KDOQI é de 29,0 pg, o qual tem concordância com o

*British Guidelines for Laboratory Diagnosis of Functional Iron Deficiency* e com o trabalho de Piva *et al* (2014), os quais demonstram maior valor preditivo positivo, quando comparado com valores de ferritina inferior a 50 µg/L e de IST% < 13%. Segundo as observações de Brugnara *et al* (2006), deve-se levar em conta que há um decréscimo nos valores de RET-He logo após o início e durante o uso de AEE, pelo aumento abrupto da eritropoiese e consequente depleção da oferta de ferro. Em nosso estudo, comparamos os resultados encontrados, observando-se o valor de corte proposto pelo KDIGO e observamos que apenas 11,8% (4/34) estavam abaixo dos valores recomendados, o que contrasta com a alta prevalência de deficiência de ferro avaliada pelo IST ou pela ferritina. Num contexto de uma crescente preocupação com o acúmulo de ferro em tecidos motivado por altas doses de ferro endovenoso, este marcador pode evitar reposição de ferro desnecessária pela interferência de variáveis clínicas e inflamatórias na dosagem de ferritina e IST, que podem estar superestimando a deficiência de ferro nesta população. Estudos futuros terão que estabelecer o valor deste novo parâmetro no diagnóstico e monitoramento da deficiência de ferro na DRC.

Outro objetivo do nosso estudo foi avaliar novos parâmetros hematológicos no contexto da resistência ao tratamento com AEE, e sua complexa relação com a inflamação e com a mobilização e utilização das reservas de ferro. Desta forma, avaliamos a resistência ao tratamento com AEE pelo valor de corte sugerido pela literatura e pelo KDIGO, 2012, que considera resistência aos AEE, valores de IRE maiores que 0,02 µg, que compreendeu 86,9% (20/23) dos indivíduos analisados em nosso estudo. No entanto, não houve diferença significativa quando comparados estes valores com os valores dos reticulócitos, RET%, RET#, IRF% (LFR, MFR, HFR) e RET-He. Por este motivo, pela limitação do número de pacientes incluídos no estudo e pela estabilidade clínica demonstrada e que caracterizou esta população, foi avaliado o IRE também a partir de quartis, a qual pode ser identificada como uma abordagem mais adequada, conforme pode ser demonstrado nas análises estatísticas descritas adiante.

Segundo Piva *et al*, (2014) o número de reticulócitos circulantes, frente a um estímulo, pode se elevar em até 15 a 20 vezes o basal, determinando uma situação denominada de “stress eritropoiético”. São lançados na circulação, neste caso, primeiramente reticulócitos imaturos, os quais possuem maior volume e carregam maior quantidade de RNA. Entre as

causas de “stress eritropoiético” esta o uso de AEE, como o que ocorre em pacientes com DRC. Portanto, nestes casos o IRF% se eleva mais rapidamente que as contagens relativa e absoluta de reticulócitos, indicando de forma mais precoce o efeito estimulatório da eritropoiese na medula óssea.

Pekelharing *et al* (2010) estabeleceu, entre indivíduos saudáveis, como valores de referencia para os parâmetros de reticulócitos RET%,RET#, IRF%, LFR%, MFR% e HFR%, utilizando o analisador Sysmex, modelo XE 5000, os quais foram: 0,43 – 1,36%; 23.000 – 70.100/ $\mu$ L; 1,6 – 10,5%; 89,9 – 98,4%; 1,6 – 9,5%; 0,0 – 1,7%, respectivamente. Estes valores foram padronizados em nosso estudo como referencia para os testes estatísticos de correlação/associação, levando-se em consideração termos utilizado para as nossas análises o mesmo analisador hematológico, Sysmex, modelo XE 5000.

Também pode ser demonstrado em nossos estudos, que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado IRF%, MFR% e LFR% com o IRE representado pelo 4º quartil (0,102), onde as médias de IRF%, MFR% e HFR% foram nitidamente maiores e a média de LFR% menor. Em contraste, não pode ser observada diferença significativa, quando comparado o IRE do 4º quartil com RET% e RET# ( $p > 0,05$ ). Este achado nos chama bastante atenção, observando-se que RET# é o exame recomendado para o acompanhamento do manejo de pacientes com DRC, em diálise e em uso de AEE. Por este motivo, talvez, quando possível, o IRF% e suas frações (HFR%, MFR% e LFR%), fossem mais indicados para este fim, pois, como pode ser percebido em nosso estudo, estes parâmetros demonstraram ter maior sensibilidade na avaliação de atividade eritropoiética em pacientes com DRC e em diálise, quando comparado com RET#. Ou ainda, conforme sugestão da *International Society of Laboratory Hematology*, serem utilizados de forma conjunta, pois, juntos são úteis na avaliação da resposta e da efetividade da atividade eritropoiética. Butarello *et al* (2016) coloca a hipótese de que esta relação é variável, independente e concordante, no sentido de que, IRF% é um índice de aceleração da eritropoiese e o RET# indica a efetividade desta. Por exemplo, valores de IRF% elevados contra RET# normal ou diminuído é achado padrão que identifica eritropoiese inefetiva.

Também foram relevantes os achados da associação entre inflamação e os novos marcadores hematopoiéticos. A DRC, por si só, pode ser considerada uma síndrome inflamatória, onde diversos marcadores de inflamação podem ser percebidos em

concentrações plasmáticas elevadas (ABENSUR, 2006). Embora a inflamação na DRC seja decorrente de infecções, comorbidades, toxicidade urêmica, em particular, pacientes submetidos a DP, conforme coloca Pecoits-Filho *et al* (2007), apresentam causas intrínsecas a este procedimento, que favorecem sobremaneira o estado inflamatório. Segundo Vianna *et al* (2011), dentre as citocinas que mais têm sido associadas DRC estão o IL-1, IL-6 e o TNF- $\alpha$ . Isso pode ser demonstrado em nosso estudo, onde foram utilizados esses mesmos marcadores IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , acrescido de MCP-1, onde, sem exceção, todos se encontraram com concentrações séricas elevadas, acima do valor máximo de referência para cada um, estabelecendo, de forma inequívoca, presença do estado inflamatório em todos os indivíduos. Estes achados abrem concordância com outros vários estudos, como os de Pecoits-Filho *et al* (2003), Del Vecchio *et al* (2005), Abensur (2006) e KANBAY *et al* (2010), que também perceberam a elevação da concentração plasmáticas destas citocinas, em pacientes com DRC e em diálise.

Em nossas análises a concentração média de IL-6 no soro, considerando todo o grupo estudado, foi de 16,6 pg/mL e o valor mínimo encontrado entre os indivíduos do estudo foi de 11,1 pg/mL, valor este muito superior ao valor máximo de referência para esta citocina no sangue. Quanto a concentração desta citocina no dialisado, os resultados mostraram também valores para IL-6 muito elevados em praticamente todos os pacientes do estudo. Este achado vai na mesma direção dos trabalhos de Stevinkel *et al* (2005) e de Pecoits-Filho *et al* (2006), nos quais a IL-6 foi descrita como um importante marcador inflamatório, principalmente nos estágios iniciais da DP, devido ao uso de solução de diálise e demonstrado também pela presença de concentrações elevadas de IL-6 no dialisado, logo após o início da DP, refletindo inflamação intraperitoneal. Também em nosso estudo, a IL-6 também foi o marcador inflamatório que demonstrou correlação com as variáveis MFR% ( $p = 0,030$ ) e tendência de associação com IRF% e LFR%, ambos com valores de  $p = 0,062$ , sendo que para esta última a correlação é inversa. Este fato pode ser entendido que a atuação da IL-6 pode estar mais associada na interferência da sobrevivência do eritrócito do que na inibição da eritropoiese, já que eleva a presença de reticulócitos mais jovens no sangue periférico (MFR% e IFR%) e, no sentido inverso, diminui o número de reticulócitos mais maduros (LFR%). No entanto, Ganz (2003) coloca a IL-6 como principal via de ativação da hepcidina, interferindo de forma direta no balanço da mobilidade e disponibilidade do ferro

para a eritropoiese, o qual constitui principal mecanismo da anemia da inflamação e que contribui de forma sustentada para o estado de anemia nos pacientes com DRC, em diálise e em uso de AEE. A IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  suprimem a expressão do gene da EPO (ABENSUR, 2006).

Finalmente, em nosso estudo houve diferença significativa entre IRF% (valores  $\leq$  10,5% e  $>$  10,5%) e valores de HB atual, 60 dias e 180 dias ( $p < 0,05$ ). Pode-se perceber que a média do valor da HB foi menor naqueles indivíduos em que o IRF% era maior que 10,5%. 67,6% da população analisada em nosso estudo faziam uso de AEE e como já reportado por diferente estudos, pode ocorrer “stress eritropoiético” no início da terapêutica com AEE. Porém, a população de nosso estudo já faziam uso de AEE há pelo menos 6 meses.

## **6 CONCLUSÃO**

Concluimos que os novos parâmetros hematológicos laboratoriais reticulocitários IRF e RET-He, quando avaliados em quartis, parecem agregar valor na identificação de mobilização e deficiência de ferro, bem como na identificação de pacientes com resistência a eritropoietina induzida pela inflamação. Estudos futuros devem validar nossos achados em populações maiores e com seguimento prospectivo.

## 7 REFERÊNCIAS

ALVES, M.T.; VILAÇA, S.S.; CARVALHO, M.G.; FERNANDES, A.P.; DUSSE, L.M.S. & GOMES, K.B. Resistance of dialyzed patients to erythropoietin. **Rev Bras Hematol Hemoter**, 2015; 37(3): 190-197.

ASTOR B.C.; MUNTNER P.; LEVIN A.; EUSTACE J.A. & CORESH J. Association of kidney function with anemia: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1988–1994). **Arch Intern Med** 162:1401–1408, 2002.

BESARAB, A. What are Common Misconceptions in Dialysis Patient Care? Anemia and Iron Management. Seminar in Dialysis, 2011: Vol 24, No 5 (September–October) 2011 pp. 498–503.

BEUTLER, E. & WAALEN, J. The definition of anemia: what is the lower limit of normal of the blood hemoglobin concentration? **Blood**, 2006. Mar 1; 107(5): 1747-50.

BRAGA, D. Contagem Global Automática: parâmetros analisados, significado clínico e causas de erro. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia – Universidade do Porto. Porto, agosto de 2014 (Disponível em: <[https://sigarra.up.pt/fmup/pt/pub\\_geral.show\\_file?pi\\_gdoc\\_id=436390](https://sigarra.up.pt/fmup/pt/pub_geral.show_file?pi_gdoc_id=436390)> Acesso em 30 de agosto de 2016).

BRUGNARA, C.; SCHILLER, B. & MORAN, J. Reticulocyte Hemoglobin Equivalent (Ret-He) and assessment of iron-deficient states. **Clin Lab Haem**, 2006, 28, 303–308.

BUTARELLO, M.; TEMPORIN, V.; CERAVOLO, R.; FARINA, G. & BULIAN, P. The New Reticulocyte Parameter (RET-Y) of the Sysmex XE 2100. **Am J Clin Pathol**, 2004; 121:489-495.

CANALS, C.; REMACHA, A.F.; SARDA, M.P.; PIAZUELO, J.M.; ROYO, M.T. & ROMERO, M.A. Clinical Utility Of The New Sysmex Xe 2100 Parameter - Reticulocyte Hemoglobin Equivalent - In The Diagnosis Of Anemia. *Haematologica* January 2005 90: 1133-1134.

CASTRO, R. C.; LOPES, A. A.; THOMÉ, F. S.; LUGON, J. R. & BURDMANN, E. A. Censo Brasileiro de Diálise. **J Bras Nefrol**, 2010. 32(4): 380-384.

CANZIANI, M. E. F.; BASTOS, M. G.; BREGMAN, R.; PECOITS-FILHO, R.; TOMIYAMA, C.; DRAIBE, S. A.; CARMO, W. B.; RIELLA, M. C.; ROMÃO JUNIOR, J. E. & ABENSUR, H. Deficiência de Ferro e Anemia na Doença Renal Crônica. **J Bras Nefrol**, 2006. 28:(2).

CHUAN, C.L.; LIU, R.S.; WEI, Y. H.; HUANG, T.P. & TARNG, D. C. Early Prediction of Response to Intravenous Iron Supplementation by Reticulocyte Haemoglobin Content and High Fluorescence Reticulocyte Count in Hemodialysis Patients. **Nephrol Dial Transplant**. 2003;18(2):370-7.

CHUNG, M.; JEFFREY, M.P.H.; CHAN, A.; DENISH-MOORTHY, B.S.; NIRA HADAR, M.S.; RATICHEK, S.J.; CONCANNON, T.W. & LAU, J. Biomarkers for Assessing and Managing Iron Deficiency Anemia in Late-Stage Chronic Kidney Disease: Future Research Needs. **Agency for Healthcare Research and Quality**. 2013.

CORESH, J.; ASTOR, B.C.; GREENE, T.; EKNOYAN, G. & LEVEY, A.S. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult U.S. population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Am J Kidney Dis** 41:1–12, 2003.

COSTA, E.; PEREIRA, B.J.; ROCHA-PEREIRA, P.; ROCHA, S.; REIS, F.; CASTRO, E.; TEIXEIRA, F.; MIRANDA, V.; FARIA, M.; LOUREIRO, A.; QUINTANILHA, A.; BELO, A. & SANTOS-SILVA, A. Role of Prohepcidin, Inflammatory Markers and Iron Status in Resistance to rhEPO Therapy in Hemodialysis Patients. **Am J Nephrol**, 2008. 28: 677-683.

(a)

COSTA, E.; ROCHA, S.; ROCHA-PEREIRA, P.; NASCIMENTO, H.; CASTRO, E.; MIRANDA, V.; FARIA, M.; LOUREIRO, A.; QUINTANILHA, A.; BELO, L. & SANTOS-SILVA, A. Neutrophil Activation and Resistance to Recombinant Human Erythropoietin Therapy in Hemodialysis Patients. **Am J Nephrol**, 2008. 28: 935-940. (b)

COSTA, E.; LIMA, M.; ALVES, JM.; ROCHA, S.; ROCHA-PEREIRA, P.; CASTRO, E.; MIRANDA, V.; LOUREIRO, A.; QUINTANILHA, A.; BELO, L. & SANTOS-SILVA, A. Inflammation, T-cell Phenotype and Inflammatory Cytokines in Chronic Kidney Disease Patients under Hemodialysis and its Relationship to Resistance to Recombinant Human Erythropoietin Therapy. **J Clin Immunol**, 2008. 28: 268-275.(c)

DEL VECCHIO, L.; POZZONI, P.; ANDRULLI, S. & LOCATELLI, F. Inflammation and Resistance to Treatment with Recombinant Human Erythropoietin. **J Ren Nutr**, 2005. 15: 137-141.

ESCHBACH, J.W.; EGRIE, J.C.; DOWNING, M.R.; BROWNE, J.K. & ADAMSON, J.W. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin: results of phase I and II clinical trial. **N Engl J Med** 1987; 316: 73–78

FERNANDES, N.; BASTOS, M. G.; PECOITS-FILHO, R.; PEREIRA, L. C.; FRANCO, M.; HADDAD, S. A.; PINHEIRO, M. R. T.; FAIFER, T. M. S.; VISONA, A. P. G.; TAVARES, E. F. W.; CARAMORI, J.; SILVA, E. C. C.; CARVALHO, R. B.; TAVARES-FILHO, H. A.; RIELLA, M.C.; DIVINO-FILHO, J. C. & GRUPO DE ESTUDO MULTICÊNTRICO EM DIÁLISE PERITONEAL NO BRASIL (ECMPD). Sucessos e Fracassos - Uma Análise dos Dados do BRAZPD Comparados às Diretrizes Espanholas. **J Bras Nefrol**, 2008. 30(1):22-31.

FISHBANE, S.; GALGANO, C.; LANGLEY, R.C.; CANFIELD, W.; MAESAKA, J. K. Reticulocyte Hemoglobin Content in the Evaluation of Iron Status of Hemodialysis Patients. **Kidney Int**, 1997; 52: 217–222.

FISHBANE, S. & BERNIS, J.S. Evidence and implications of haemoglobin cycling in anaemia management. **Nephrol Dial Transplant**, 2007. Aug: 22(8): 2129-32

GANZ, T. Hcpidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. **Blood**, 2003; v102:(3)

GONÇALVES. S.; DAL LAGO, E.A.; MORAES, T.P.; KLOSTER, S.C.; BOROS, G.; COLOMBO, M.; RABONI, L.; OLANDOSKI, M.; FERNANDES, N.; QURESHI, A.R.; DIVINO-FILHO, J.C. & PECOITS-FILHO, R. Lack of Adequate Predialysis Care and Previous Hemodialysis, but Not Hemoglobin Variability, Are Independent Predictors of Anemia-Associated Mortality in Incident Brazilian Peritoneal Dialysis Patients: Results from the BRAZPD Study. **BLOOD PURIFICATION**, 2012, Vol. 34, No. 3-4.

GROTTO, H.Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, 2008;30(5):390-397.

GUERRERO-RISCOS, M.A.; MONTES-DELGADO, R.; SEDA-GUZMÁN, M. & PRAENA-FERNÁNDEZ, J.M. Resistencia a eritropoyetina y supervivencia en pacientes con enfermedad renal crónica 4-5 no-D y enfermedad cardíaca. **Nefrología**, 2012;32(3):343-52

HAUSER, A.B.; STINGHEN, A.E.M.; KATO, S.; BUCHARLES, S.; AITA, C.; YUZAMA, Y. & PECOITS-FILHO, R. Characteristics and Causes of Immune Dysfunction Related to Uremia and Dialysis, 2008; **Peritoneal Dialysis International**, Vol. 28 (2008), Supplement 3.

HAYAT, A. Erythropoietin Friend or Foe in Chronic Kidney Disease Anemia: An Analysis of Randomized Controlled Trials, Observational Studies and Meta-Analyses. *BJMP*, 2009.

HOFFBRAND, A.V. & MOSS, P.A.H. **Fundamentos em Hematologia**. Artmed, Porto Alegre, 6ª ed, 2013.

JOÃO, A.R.; PINTO, S. & COSTA, E. Reticulocytes Subpopulations and Immature Reticulocytes Fraction as Indicators of Increased Erythropoiesis in Patients with Iron Deficiency Anemia. **Rev Bras Hematol Hemater**, 2008;30(3):188-192.

JUNIOR, J.E.R. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. **J Bras Nefrol**. 2004. 26 [3 (1)].

KALANTAR-ZADEH, K.; MCALLISTER, C.J.; LEHN, R.S.; LEE, G.H.; NISSENSON, A.R. & KOPPLE, J.D. Effect of malnutrition-inflammation complex syndrome on EPO hyporesponsiveness in maintenance hemodialysis patients. **Am J Kidney Dis**, 2003;42:761–773.

KANBAY, M.; PERAZELLA, M.A.; KASAPOGLU, B.; KOROGLU, M. & COVIC, A. Erythropoiesis Stimulatory Agent-Resistant Anemia in Dialysis Patients: Review of Causes and Management. **Blood Purif**, 2010. 29:1-12.

KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease. **Am J Kidney Dis**. 2006. May;47 (5 Suppl 3): S11-145.

KEMMA, E.; TJALSMA, H.; WILLEMS, H. & SWINKELS D. Hepcidin: from Discovery to Differential Diagnosis. **Haematologia**, 2008, 93: 90-97.

KDIGO Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease. **Kidney International Supplements**. 2006.47(5 Suppl 3):S11-145 .

KDIGO Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease. **Kidney International Supplements**. 2012. Aug.

KOURY, S.T.; BONDURANT, M.C. & KOURY, M.J. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. **Blood**, 1988. Feb;71(2):524-7.

ISEKI, K. & KOHAGURA, K. Anemia as a risk factor for chronic kidney disease. **Kidney Int Suppl**, 2007. Nov(107): S4-9.

MACDOUGALL, I.C. & COOPER, A.C. Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. **Nephrol Dial Transplan**, 2002. 17[Suppl 11]: 39-43.

MACDOUGALL, I.C. Could anti-inflammatory cytokine therapy improve poor treatment outcomes in patients dialyses?. **Nephrol Dial Transplant**, 2004. 19 [Suppl 5], v73 – v78.

MAST, A.E.; BLINDER, M.A. & DIETZEN, D. J. Reticulocyte Hemoglobin Content. **Am J Hematol**, 2007.

MIRANDA, J.C. Tese de Mestrado: Avaliação da Expressão de Hepsidina e Produção de IL-6 por Monócitos de Indivíduos Idosos. FCFRP-USP, 2009.

MIWA, N.; AKIBA, T.; KIMATA, N.; HAMAGUCHI, Y.; ARAKAWA, Y.; TAMURA, T. & NITTA, K. National Kidney Foundation: KDOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis*. 2002(39)(Suppl. 1):S1-S266.

OLIVEIRA, R.A.G. Hemograma: como fazer e interpretar. 1a. ed, Editora LMP, 2007.

O'MARA, N.B. Anemia in Patients with Renal Chronic Disease. **Diabetes Spectrum**, 2008, v21, n1.

PECOITS-FILHO, R.; HEIMBURGER, O.; BARANY, P.; SULIMAN, M.; FEHRMAN-EKHOLM, I.; LINDHOLM, B. & STENVINKEL, P. Associations Between Circulating Inflammatory Markers and Residual Renal Function in CRF Patients. **Am J Kidney Dis**, 2003. 41: 1212-1218.

PECOITS-FILHO, R; CARVBALHO, M.J.; STENVINKEL, P.; BENGT LINDHOLM, B. & HEIMBÜRGER, O. Systemic and Intraperitoneal Interleukin-6 System During the First Year of Peritoneal Dialysis. **Perit Dial Int**, 2006; 26:53-63.

PEKELHARING, J.M.; HAUSS, O.; JONGE, R.; LOKHOFF, J.; SODIKROMO, K.; SPAANS, M.; BROWER, R.; LATHOUDER, S. & HINZMANN, R. Haematology Reference Intervals for Stablished and Novel Parameters in Healthy Adultts. **Sysmex Journal International**, v(20), n(1), 2010.

PIPERNO, A.; MARIANI, R.; TROMBINI, P. & GIRELLI, D. Hecpidin modulation in human diseases: From research to clinic World. **Journal of Gastroenterology**, 2009, 15: 538–551.

PIVA, E.; BRUGNARA, C.; SPOLAORE, F. & PLEBANI, M. Clinical Utility of Reticulocyte Parameter. **Clin Lab Med**, 2014.

PUNNONEN, K.; IRJALA, K. & RAJAMAKI, A. Serum Transferrin Receptor and its Ratio to Serum Ferritin in the Diagnosis of Iron Deficinecy. **Blood**. 1997;89(3):1052-7.

SESSO, R.; LOPES, A. A.; THOMÉ, F. S.; BEVILACQUA, J. L.; ROMÃO-JUNIOR, J. E. & LUGON, J. Dialysis Census Results - 2007 from the Brazilian Society of Nephrology. **J Bras Nefrol**, 2007. 29:(4).

SILVA, P.H.; ALVES, H.B.; COMAR, S.R.; HENNEBERG, R.; MERLIN, J.C. & STINGHEN, S.T. **Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos**. Artmed, Porto Alegre, 2016.

SMRZOVA, J.; BALLAS, J. & BÁRÁNY, P. Inflammation and resistance to erythropoieses-stimulating agents – what do we know and what needs to be clarified?. **Nephrol Dial Transplant**, 2005. 20 [Suppl 8]:viii2–viii7.

SOLOMON, S.D.; UNO, H.; LEWIS, E.F. Erythropoetic reponse and outcomes in kidney disease and type 2 diabetes. **N Engl J Med**, 2010. 363(12): 1146-1155.

TATSUMI, N. & IZUMI, T. Reticulocyte maturation index as a useful diagnostic parameter. **Sysmex Int**, 1991;1:23–28.

THOMAS, C. & THOMAS, L. Biochemical Markers and Hematologic Indices in the Diagnosis of Functional Iron Deficiency. **Clinical Chemistry**, 2002;48:7:1066-1076.

VIANNA, H.R.; SOARES, C.M.B.M.; TAVARES, M.S.; TEIXEIRA, M.M. & SILVA, A.C.S. Inflamação na Doença Renal Crônica: Papel de Citocinas. **J Bras Nefrol**, 2011;33(3):351-364.

YANG, W.; ISRANI, R.K.; BRUNELLI, S.M.; JOFFE, M.M.; FISHBANE, S. & FELDMAN, H.I. Hemoglobin variability and mortality in ESRD. **J Am Soc Nephrol**. 2007. Dec; 18(12): 3164-70.

WEISS, G. & GOODNOUGH, L.T. Anemia if Chronic Disease. **N Engl J Med** 2005;352:1011-23 .

WOLLMANN, M.; GERZSON, B.M.C.; SCHWERT. V.; FIGUERA, R.W. & RITZEL, G.O. Reticulocyte Maturity Indices in Iron Deficiency Anemia. **Rev Bras Hematol Hemater**, 2014;36(1):25-28.

## 8 ANEXOS

### Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ( TCLE)

Eu,.....  
(nacionalidade), ..... (estado civil) de ..... anos de idade, portador do  
RG:..... residente no endereço  
....., sou convidado a participar de uma  
pesquisa denominada "*Hipervolemia e sua correlação com inflamação, endotoxinas, anemia e desnutrição em pacientes em diálise peritoneal*" que tem como objetivo avaliar a correlação existente entre hipervolemia nos pacientes em diálise peritoneal, presença de endotoxinas no líquido peritoneal, inflamação sistêmica, anemia e desnutrição. Minha participação no referido estudo será no sentido de oferecer informações referentes ao meu tratamento e aos meus hábitos alimentares. Participarei de uma avaliação nutricional, que consiste na medição de peso, altura, circunferência do braço, pregas cutâneas e análise de composição corporal, como massa magra e massa gorda, e volume corporal. Durante a realização dos meus exames de sangue rotineiros, realizados mensalmente ou a qualquer época, uma fração ou alíquota do material colhido será analisado pelo grupo de pesquisa. Também ofereço de livre e espontânea vontade uma amostra de líquido peritoneal drenado conforme as orientações recebidas pelo grupo. Recebi esclarecimentos de que não terei risco algum por participar da pesquisa. Para estas avaliações, toda a privacidade será respeitada e será feita somente com a presença do pesquisador. Estou ciente de que, a partir desta pesquisa, podem-se obter benefícios como maior conhecimento sobre os aspectos nutricionais e sua relação com a doença renal, mas que os resultados só serão divulgados após o término da pesquisa. Esse estudo não irá me ofertar qualquer risco ou despesas. Estou participando de forma voluntária, assim posso me recusar a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo para mim. Fui informado que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar minha identidade, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa me identificar em publicações posteriores à pesquisa serão mantidos em sigilo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são prof<sup>a</sup> nutricionista Cyntia Erthal Leinig, estagiárias de nutrição Edieiny Maier, Jéssica Koslowski e Jéssica Zienlinski, estagiárias do curso de Nutrição, professor Júlio Cezar Merlin dos cursos de Farmácia e de Medicina, procedentes da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, a prof.<sup>a</sup> Enfermeira Cristian Carla A. Volski Cassi da Universidade Federal do Paraná, aluna do Doutorado na Pontifícia Universidade Católica do Paraná, (demais participantes). É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas conseqüências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação. Desenvolver estudos nesta área é de grande importância para a melhoria do tratamento dialítico, bem estar e qualidade de vida dos pacientes.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Curitiba, ... de ... de 20\_\_\_\_.

*Nome e assinatura do sujeito da pesquisa*

*Nome(s) e assinatura(s) do(s) pesquisador(es) responsável(responsáveis)*

## Anexo 2: Parecer de Aprovação - Comitê de Ética



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
Universidade Estadual de Londrina  
Registro CONEP 268

<b>Parecer CEP/UEL:</b>	357/2011
<b>CAAE:</b>	0326.0.268.000-11
<b>Processo:</b>	33936.2011.94
<b>Folha de Rosto:</b>	474888
<b>Pesquisador(a):</b>	Luiz Fernando Kunii
<b>Unidade/Órgão:</b>	CCS - Departamento de Clínica Médica

Prezado(a) Senhor(a):

O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

**"Hipervolemia nos Pacientes em Diálise Peritoneal e sua Correlação Inflamação, Stress Oxidativo e Endotoxinas"**

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.

Londrina, 15 de fevereiro de 2012.

**Profa. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos  
Universidade Estadual de Londrina